

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

Joaquim Gasparini dos Santos

Influência da nicotina na expressão gênica de HIF-1 α ,
PI3K, AKT, ERK1/2 e CA-IX em linhagens celulares
SCC9 e DOK.

VITÓRIA

2017

Joaquim Gasparini dos Santos

Influência da nicotina na expressão gênica de HIF-1 α ,
PI3K, AKT, ERK1/2 e CA-IX em linhagens celulares
SCC9 e DOK.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Surama Freitas
Zanini

Co-orientador(a): Prof^a Dr^a Adriana
Madeira Alvares da Silva

VITÓRIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

S237i Santos, Joaquim Gasparini dos, 1990 -
Influência da nicotina na expressão gênica de HIF-1 α , PI3K, AKT,
ERK1/2 e CA-IX em linhagens celulares SCC9 e DOK / Joaquim Gasparini
dos Santos – 2017.
61 f. : il.

Orientador: Surama Freitas Zanini.

Coorientador: Adriana Madeira Alvares da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Boca. 2. Nicotina. 3. Linhagem Celular. I. Zanini, Surama Freitas.
II. Silva, Adriana Madeira Alvares da. III. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Joaquim Gasparini dos Santos

Análise da influência da nicotina na expressão gênica de
HIF-1 α , PI3K, AKT, ERK1/2 e CA-IX em linhagens
celulares SCC9 e DOK.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Prof^a. Dr^a. Surama Freitas Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Alvares da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-Orientador

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin
Universidade Federal do Espírito Santo

VITÓRIA

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que me proporcionou, pela oportunidade de realizar uma pós-graduação em uma instituição pública e por me dar forças para não desistir.

Aos meus pais por todo apoio e pela educação que recebi para vida.

A minha irmã Karla Gasparini, que mesmo atarefada com sua tese de doutorado teve tempo de dar suporte e corrigir minha dissertação.

Ao professor Dr. Fabio Daumas Nunes, por ser sempre solícito em nos atender quando precisávamos e por ter cedido o laboratório para que possamos realizar nossos experimentos.

A técnica Adriana Fraga Costa, pelo ensinamento e apoio durante nosso experimento.

Ao professor Dr. Roger Chammas por ter por ter cedido seu laboratório para realizarmos experimento de câmara de hipóxia e sua aluna de Pós-graduação Mayara D'Auria Jacomassi pelo suporte e ajuda durante o experimento.

A minha orientadora, Professora Dr. Surama Freitas Zanini e co-orientadora Professora Dr. Adriana Madeira pelo suporte.

Aos meus amigos Mayara Mota de Oliveira, Gabriela Tonini Peterle e Lucas de Lima Maia, não apenas pela ajuda com meu trabalho com a correção e a tão odiada estatística, mas pela amizade e suporte sempre oferecidos de bom grado.

Ao Renato Graciano de Paula, por repassar todas as formas possíveis de se gerar dados estatísticos para real time.

A Ana Carolina, veterinária mais gata, pelo apoio moral e psicológico durante todo esse processo.

Ao Departamento e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo –UFES e também a FAPES, pelo apoio a minha participação no mestrado.

Agradeço a todos, que direta ou indiretamente, de alguma forma me auxiliaram nesta jornada e tornaram possível a realização deste trabalho.

“Mesmo Que Você Leia Muitas Escrituras Sagradas
E Mesmo Que Você Fale Muito Sobre Elas, O Que
De Bom Elas Podem Fazer Por Você Se Não Agir
Sobre Isto?”

BUDA

RESUMO

O carcinoma epidermoide de cavidade oral (CEC oral) é o tipo mais comum de neoplasia maligna que acomete a cavidade oral, normalmente conduzido pelo surgimento de lesões pré-malignas, como a leucoplasia. O uso de tabaco compreende um dos maiores fatores de risco para o seguimento de CEC oral. A nicotina é o maior composto natural presente no tabaco, estudos vem apontando que sua ligação a Receptores Nicotínico de Acetilcolina (nAChRs) leva a um aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e de fatores de crescimento que se ligam a Receptores Tirosina Quinase (RTK) desencadeando ativação de vias de MAPK's e fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K/Akt), que culminam na ativação da proteína HIF-1 α e expressão de CA-IX, conduzindo a um aumento na proliferação celular, migração, metástases e a inibição da apoptose de células tumorais. Com este fim avaliamos a expressão dos genes ERK1/2, PI3K, AKT, HIF-1 α e CA-IX em cultura celular de SCC9 e DOK expostos a diferentes concentrações de nicotina e a câmara de hipóxia em tempos variados. As análises do efeito das concentrações crescentes de nicotina e a exposição à câmara de hipóxia, nas linhagens celulares de SCC9 e DOK, na viabilidade celular e na expressão dos genes em questão foram realizados através de técnica de MTS e Real time. Os resultados apontam maiores expressões em HIF-1 α , PI3K, AKT, ERK1/2 e CA-IX em SCC9 no tempo de 24 horas, em cultivados em concentração de 0,1mM de nicotina, quando comparado com o controle. Comparando a expressão das concentrações de nicotina com células cultivas em câmara de hipóxia, nota-se um maior expressão no tempo de 24 horas em 0,1mM dos genes HIF-1 α , PI3K, AKT e ERK1/2, já CA-IX ficou com uma expressão baixo de câmara de hipóxia. Os resultados de DOK demonstram que a nicotina causa um pequeno aumento em relação ao controle na expressão de HIF-1 α em 5mM, AKT em 2,5mM e ERK1 em 0,1mM no tempo de 8 horas, já para o tempo de 24 horas observou-se um pequeno aumento em ERK2 na concentração de 2mM. Comparado câmara de hipóxia com o controle as demais concentrações e nicotina, observou-se que apenas em HIF-1 α a expressão foi menor no tempo de 8 horas, mas em 24 horas essa expressão superou as expressões no controle e nas células expostas a nicotina. Conclui-se que a nicotina é capaz de modular uma maior expressão em SCC9 dos genes em questão do que

em DOK.

Palavras-chaves: Cavidade Oral. Nicotina. PI3K/AKT. ERK1/2. HIF-1 α . CAIX.

ABSTRACT

Oral cavity squamous cell carcinoma (oral SCC) is the most common type of malignancy that affects an oral cavity, usually driven by the pre-malignant lesions, such as leukoplakia. Smoking is one of the main risk factors for oral SCC. Nicotine is the major natural compound present in tobacco, studies have pointed out that its binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors (nAChRs) leads to an increase in the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and of growth factors that bind to Receptor Tyrosine Kinase (RTK) triggering the activation of MAPKs and Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K / Akt), culminating in the activation of the HIF-1 α protein and CA-IX expression, leading to increased cell proliferation, migration, metastasis and inhibition of tumor cell apoptosis. For this purpose we evaluated the expression of genes ERK1 / 2, PI3K, AKT, HIF-1 α and CA-IX in cell culture and SCC9 DOK exposed to different concentrations of nicotine and hypoxia chamber at various times. The effect of increasing concentrations of nicotine and exposure to hypoxia chamber in cell lines of DOK and SCC9, cell viability and expression of the genes in question were performed using the MTS technique and Real Time. The results showed higher expression of HIF-1 α , PI3K, AKT, ERK1 / 2 and CA-IX in SCC9 at 24 hours in cultivars with 0.1 mM nicotine concentration when compared to control. Comparing the expression of nicotine concentrations with cultured cells in a hypoxia chamber, a greater 24 h time expression in 0.1 mM of HIF-1 α , PI3K, AKT and ERK1 / 2 genes was noted, whereas CA-IX was a low expression of hypoxia chamber. The DOK results show that nicotine causes a small increase over control in the expression of HIF-1 α in 5 mM, AKT in 2.5 mM and ERK1 in 0.1 mM in the time of 8 hours, during the 24 hours observed a small increase in ERK2 at 2 mM concentration. Compared hypoxia chamber with the control other concentrations and nicotine, it was observed that only in HIF-1 α the expression was lower in the time of 8 hours, but in 24 hours this expression exceeded the expression in the control and in the nicotine exposed cells. It is concluded that nicotine is able to modulate a higher expression of genes in question SCC9 than DOK.

Key-words: Oral Cavity. Nicotine. PI3K / AKT. ERK1 / 2. MAPK. HIF-1 α . CAIX.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da ativação da via de ERK1/2 através da estimulação de receptores tirosina quinase (RTK).....	21
Figura 2. Representação esquemática da ativação da via de PI3K/AKT através da estimulação de receptores tirosina quinase (RTK).....	23
Figura 3. Processos envolvidos na via de transcrição HIF-1 para a regulação do pH em células tumorais. Fonte: PASTOREKOVA et. al., 2008.....	25
Figura 4. Viabilidade celular de SCC9 e DOK.....	34
Figura 5. Expressão de HIF-1 α em SCC9.....	36
Figura 6. Expressão de HIF-1 α em DOK.....	37
Figura 7. Expressão de PI3KCA em SCC9.....	39
Figura 8. Expressão de AKT1 em SCC9.....	40
Figura 9. Expressão de PI3KCA em DOK.....	41
Figura 10. Expressão de AKT1 em DOK.....	42
Figura 11. Expressão de ERK1 em SCC9.....	43
Figura 12. Expressão de ERK2 em SCC9.....	44
Figura 13. Expressão de ERK1 em DOK.	45
Figura 14. Expressão de ERK2 em DOK.	46
Figura 15. Expressão de CA-IX em SCC9..	48
Figura 16. Expressão de CA-IX em DOK..	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primer qPCR.....	31
--	----

LISTA DE SIGLAS

AKT – Homóloga celular ao oncogene v-AKT

CA-IX – Anidrase Carbônica 9

CBP/300 – Co-ativador do complexo HIF

CECP – Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço

CO₂ – Dióxido de carbono

ERK1/2 - Quinase regulada pela sinalização extracelular

FIH – Fator de inibição de hipóxia

Gbr - Proteína de adaptação

GDP - Guanosina difosfato

Glu – Ácido Glutâmico

GTP - Guanosina trifosfato

HCO₃ – Bicarbonato

HIF-1 α – Fator de indução de hipóxia -1 alpha

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LDH - Lactato Desidrogenase

MAPK – Proteína quinase mitógeno ativada

MCT4 - Transportador Monocaboxilato

MEK1/2 – Isoformas de MAP quinases

mM - milimolar

naChRs - Receptore Nicotínico de Acetilcolina

NHE1 - Canais de Na⁺/H⁺

PDK1/2 – Proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase

PIP2 – Fosfoinositol-bi-fosfato

PIP3 – Fosfoinositol-tri-fosfato

PTB - Domínio de ligação de fosfotirosina

PTEN - Fosfatase e tensina homóloga

RAF-1 - Proteína capaz de fosforilar MEKs

RAS – Superfamília das proteínas G

ROS – Espécie Reativa de Oxigênio

RTK – Receptor Tirosina Quinase

Shc – Proteína de Adaptação

SOS – Son of sovenless

Thr – Treonina

Tyr – Tirosina

VHL - Complexo von Hippel-Lindau

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
1.1. Carcinoma Epideroide de Cabeça e Pescoço e Cavidade Oral.....	17
1.2. Nicotina e via progressão tumoral.....	18
1.2.1. MAPK's	20
1.2.2. PI3K.....	21
1.2.3. HIF e CA-IX	23
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. Metodologia	28
3.1. Cultura celular	28
3.2. Ensaio de Viabilidade Celular	29
3.3. Extração de RNA e análise da integridade.....	30
3.4. Tratamento e Síntese de cDNA	30
3.5. PCR em tempo real	31
3.6. Análise Estatística.....	32
4. Resultados.....	33
4.1. Viabilidade celular	33
4.2. Efeito da nicotina na expressão do gene HIF-1 α em SCC9 e DOK.	35
4.2.1. SCC9	35
4.2.2. DOK.....	36
4.3. Efeito da nicotina na expressão dos genes PI3K e AKT.....	38
4.3.1. SCC9	38
4.3.2. DOK.....	40
4.4. Efeito da nicotina na expressão dos genes ERK1/2.	42
4.4.1. SCC9	42

4.4.2. DOK.....	44
4.5. Efeito da nicotina na expressão dos genes CA-IX.	47
4.5.1. SCC9	47
4.5.2. DOK.....	48
5. Discussão	50
6. Conclusão	55
7. Referências.....	56

1. Introdução

1.1. Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço e Cavidade Oral

O câncer de cabeça e pescoço é um termo que abrange tumores malignos que acometem o trato aerodigestivo superior, com maior risco de acometimento da cavidade oral, faringe (compreendida pela orofaringe, nasofaringe, hipofaringe) e laringe. Dentre os tumores malignos de cabeça e pescoço, o de cavidade oral possui maior incidência, com aproximadamente 500 mil novos casos reportados anualmente, resultando em 145 mil mortes (WHO, 2014; CHI et. al., 2015). No Brasil, o INCA estimou para o ano de 2016, 11.140 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres, representando, assim, um risco estimado de 11,27 novos casos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

Entre os relatos de tumores do trato aereodigestivo superior, 90% são classificados como carcinoma epidermoide. O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) (do inglês: *head and neck squamous cell carcinoma* - HNSCC) é uma neoplasia maligna que tem sua origem no epitélio de revestimento. Este carcinoma é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, com mais 540.000 novos casos reportados anualmente, resultando em mais de 271.000 mortes. O carcinoma epidermoide de cavidade oral (CEC oral) é o tipo mais comum de neoplasia maligna que acomete a cavidade oral. Pouco mais de 50% dos pacientes com CEC oral sobrevivem por mais de 5 anos após o diagnóstico (MAJCHRZAK et. al., 2014; CHI, et. al., 2015; (ABIDULLAH et al., 2014; DONG et al., 2015; MARUR; FORASTIERE, 2016).

O CEC oral normalmente é conduzido pelo surgimento de lesões pré-malignas, como a leucoplasia oral. A leucoplasia oral são manchas brancas ou placas que não

pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como qualquer outra doença, de surgimento comum em lábios, língua, mucosa oral e gengiva com propensão de se tornar maligna. No entanto, o mecanismo de transformação maligna da leucoplasia oral ainda não está claro (ABIDULLAH et al., 2014; DONG et al., 2015).

Indivíduos tabagistas tem maior propensão a desenvolver leucoplasia oral do que os não tabagistas, devido a repetidas exposições de agentes carcinogênicos presente no tabaco. A cessação do hábito tabagico leva a uma diminuição da leucoplasia até mesmo seu desaparecimento (HASHIBE et al., 2000; SCHEPMAN et. al., 2001).

O uso de tabaco compreende um dos maiores fatores de risco para o seguimento de CEC oral. O tabaco possui mais de 7.000 substâncias descritas em sua composição, dentre elas 60 são carcinogênicas, e com isso o risco de um fumante desenvolver câncer oral é de 7 a 10 vezes maior do que um indivíduo que nunca fumou (XU et al., 2007; GRANDO, 2014).

1.2. Nicotina e via progressão tumoral

A nicotina é o maior composto natural biossintetizado pela planta *Nicotiana tabacum* e o principal responsável pela dependência dos usuários de tabaco. Mesmo não sendo considerado um composto carcinogênico, evidências crescentes vêm apontando a participação da nicotina no crescimento tumoral, indução de metástase, progressão celular, migração, angiogênese e evasão apoptótica das células tumorais de câncer de pulmão, cabeça e pescoço, rins e bexiga, sistema gástrico, pâncreas, vesícula biliar, fígado e cólon (MACHA et al., 2011; GRANDO, 2014).

Estudos realizados com linhagens celulares CNE 1 e 2 (nasofaringe), SCC25 (cavidade oral) e A549 (pulmão), têm demonstrado uma relação significativa entre a nicotina e sua ligação em receptores nicotínico de acetilcolina (nAChRs) na ativação

de vias de transdução de sinais relevantes para a carcinogênese (SHI et al., 2012; GUO et al., 2012; GEMENETZIDIS et al., 2009).

A ligação da nicotina a nAChRs, está diretamente relacionada ao aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), que é aproveitado pelas células para fins de sinalização celular. A produção de ROS mediante a presença de nicotina ainda não foi totalmente elucidada, mas acredita-se que a ligação da nicotina a nAChRs gera um acúmulo de Ca^{2+} no citoplasma que culmina em um influxo dos íons para o interior da mitocôndria, induzindo a ativação de seu metabolismo. Assim, o aumento da concentração de Ca^{2+} pode estar diretamente ligado ao aumento na geração de ROS (GUO et al., 2012; LI et al., 2013)

O acúmulo de ROS no interior da célula demonstraram capacidade de ativar receptores tirosina quinase (RTK), sem a presença de seus ligantes correspondentes, levando a ativação da via de ERK1/2 e de PI3K/AKT (ZHANG et al., 2016).

Além de gerar ROS, a ligação da nicotina com nAChRs induz a produção de fatores de crescimento, neurotransmissores e fatores angiogênicos, que se ligam a RTK, ativando vias ERK1/2 e de PI3K/AKT, conduzindo assim a um aumento na proliferação celular, migração, metástases e a inibição da apoptose de células tumorais (SCHAAL; CHELLAPPAN, 2014).

O estímulo de receptores presentes na membrana celular pela nicotina, indução de fatores de crescimento, citocinas e geração de ROS, demonstram ter um papel fundamental na ativação de HIF-1 α em condições de não hipóxia, através da ativação de vias mitógenas e anti-apoptóticas (ZHANG et al., 2007; JUNG et al., 2008).

1.2.1. MAPK's

As MAPK's são uma família de Serina/Treonina quinases, que atuam na regulação dos processos fisiológicos das células (figura 1). Sabe-se que aberrações na sinalização de ERK1/2 geram diversas doenças, incluindo muitos tipos de câncer (CAGNOL & CHAMBARD, 2010). Estas enzimas são ativadas por meio de uma cascata de fosforilação sequencial que amplifica a transdução de sinais da membrana celular para o núcleo. A ativação das ERK1/2 tem início com a estimulação e fosforilação de receptores tirosina quinase (RTK). A fosforilação em tirosina do RTK permite a ligação de proteínas de adaptação, que apresentam em sua sequência aminoácidos específicos de interações proteína-proteína (SANG et. al., 2003).

Após RTK ser ativado, a proteína adaptação Shc liga-se a uma fosfotirosina específica do receptor por meio do domínio PTB. A associação de Shc com o receptor leva a fosforilação em tirosina de Shc pelo próprio RTK ou por outra quinase intracelular, como Src. Essa fosforilação permite a ligação de outra proteína de adaptação a Grb2. Essas associações levam a um aumento na quantidade de Grb2 integradas ao receptor. Como o fator de troca de nucleotídeo guanina Sos (*son of sevenless*) liga-se constitutivamente Grb2; a ligação de Grb2 com o RTK também recruta Sos. A ligação de Sos ao RTK leva a uma troca de Ras-GDP por GTP na membrana plasmática. Ras-GTP interage com Raf-1, ligando-se ao domínio regulador N-terminal da quinase. Ras-GTP dirige Raf-1 para a membrana plasmática onde é ativada por fosforilação em tirosina em Tyr-340 e Tyr-341 pela quinase Src (RAMOS & BIOLOGY, 2008).

A partir da ativação de Raf-1, ela pode fosforilar MEK 1/2. MEK 1/2 fosforiladas, irão funcionar como uma serina/treonina quinase de dupla especificidade, como ERK 1/2 possui uma sequência Thr-Glu-Tyr na alça de ativação do domínio catalítico da quinase, ela será fosforilada por MEK 1/2. ERK 1/2 ativada rapidamente transloca-se para o núcleo, onde é funcionalmente sequestrada e regula a atividade de proteínas nucleares, incluindo fatores de transcrição (WIDMANN et al., 1999). Estudos

mostraram que as ERK1/2 estão envolvidas na regulação da síntese de HIF-1 α e também na sua ativação transcricional, pois as ERK's realizam a fosforilação do co-ativador CBP/ 300, aumentando a afinidade do complexo HIF-1/p300, estimulando sua ativação transcricional (MAGGIONI et al., 2011).

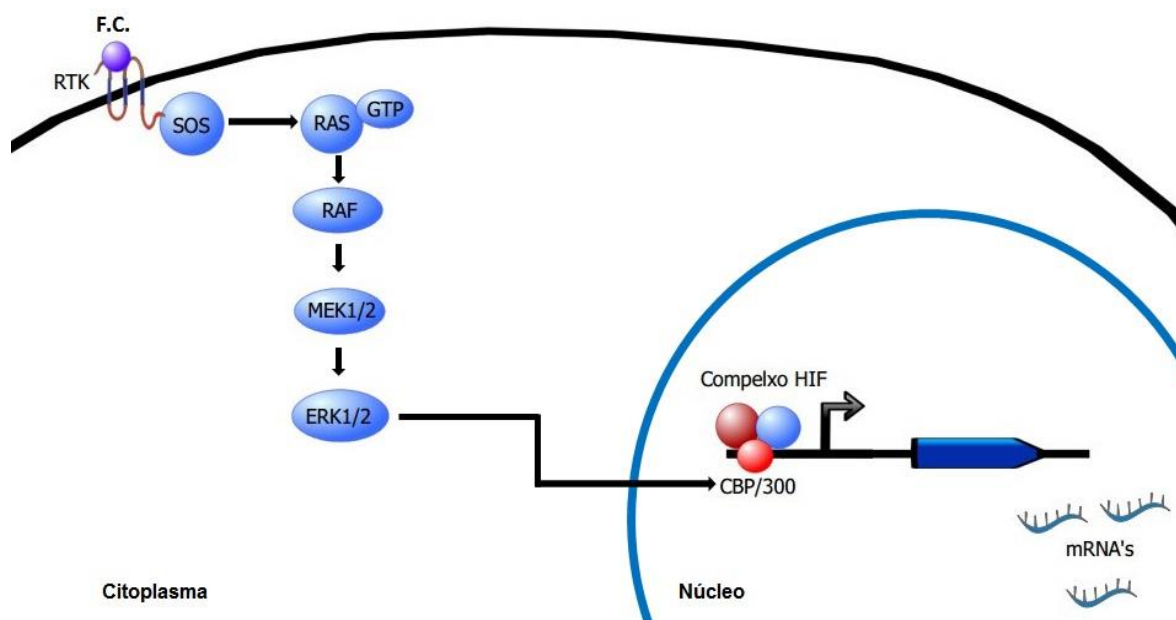


Figura 1. Representação esquemática da ativação da via de ERK1/2 através da estimulação de receptores tirosina quinase (RTK).

1.2.2. PI3K

As PI3Ks são uma família de quinases lipídicas intracelulares que fosforilam o grupo 3'-hidroxila de fosfatidilinositóis e fosfoinositídeos. A via PI3K/AKT é compreendida por uma cascata de serina/treonina quinases que acaba regulando vários processos celulares como a progressão do ciclo celular, sobrevivência celular, migração e síntese de proteínas. Estudos vêm revelando que alterações na regulação dessa via estão associadas à promoção da tumorigênese e angiogênese em diversas neoplasias (HEEG et al., 2011; SINGH; PILLAI; CHELLAPPAN, 2011; SCHAAL; CHELLAPPAN, 2014).

A ativação de PI3K/AKT é realizada também por RTK (figura 2). Assim que o receptor é ativado sua porção intracelular é fosforilada sendo utilizada como sítio de ancoragem para PI3K. Após a ancoragem PI3K é fosforilada e converte PIP2 (fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato) em PIP3 (fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato). Após a formação de PIP3 há o recrutamento de PDK1 que contém um domínio PH que se liga a PIP3 desencadeando a ativação de PDK1, que irá fosforilar AKT em T308 ativando sua atividade serina/treonina quinase. Uma vez fosforilada em T308, a ativação final de AKT ocorre por PDK2 (o complexo rictor/mTOR ou DNA-PK) através da fosforilação em S473.

A total ativação de AKT estimula a progressão do ciclo celular, a sobrevivência, o metabolismo e a migração através da fosforilação de muitos substratos fisiológicos. O gene supressor tumoral PTEN (fosfatase e tensina homóloga) é responsável por desfosforilar PIP2 e PIP3, mas com a perda ou até mesmo com a diminuição de sua expressão ocorre um estímulo da atividade de PI3K, levando a ativação elevada de AKT. Evidências demonstram que ROS é capaz de inativar PTEN, por ser capaz de promover a fosforilação de PTEN, o que leva a entrar na via de degradação proteossomal (FRESNO VARA et al., 2004; CARNERO et al., 2008, (ZHANG et al., 2016).

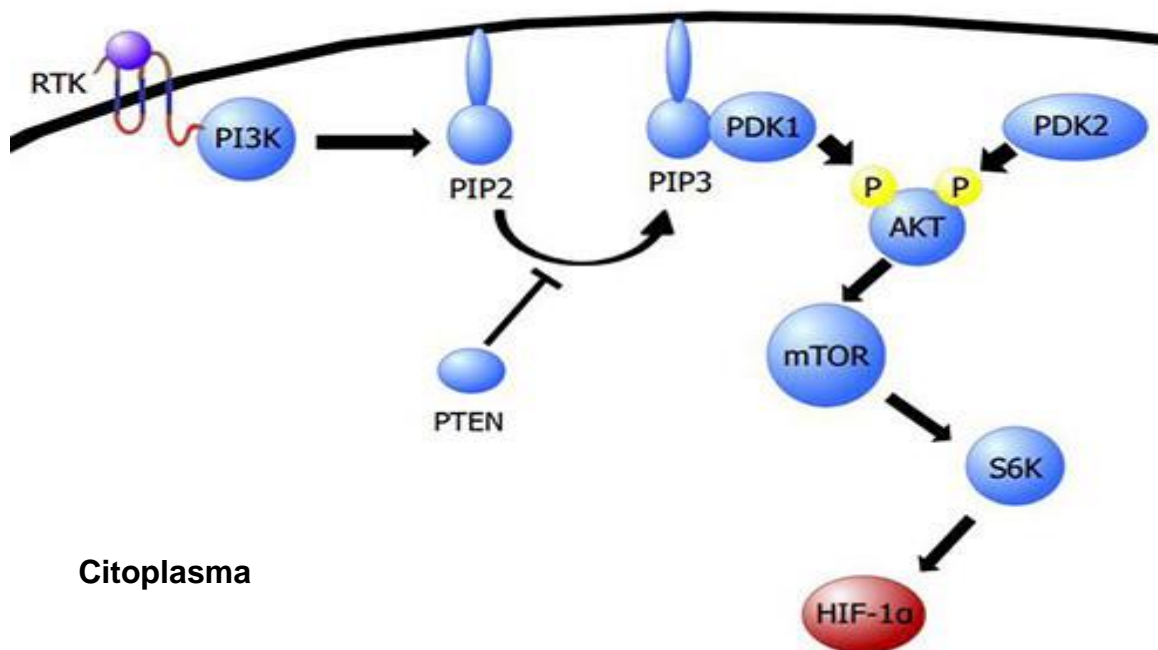


Figura 2. Representação esquemática da ativação da via de PI3K/AKT através da estimulação de receptores tirosina quinase (RTK).

1.2.3. HIF e CA-IX

Mudanças ocorridas no microambiente de células tumorais, como hipóxia e acidose celular, podem induzir a sinalização entre o estroma e as células neoplásicas, o que leva a uma mudança nas características fenotípicas destas células e desencadeia um comportamento de proliferação anormal, diminuição da adesão, migração celular, invasão, resistência e angiogênese, devido à ativação do complexo HIF-1 (figura 3) (TEPPO et. al., 2013; PASTOREKOVA et. al., 2008).

O complexo HIF-1 é um fator de transcrição que ativa a expressão de diversos genes envolvidos em vários aspectos de processos celular e fisiológicos. Esse complexo é composto por uma subunidade - alpha e uma subunidade – beta. Em

condições de normóxia, a HIF1 α é normalmente sintetizada, porém rapidamente degradada após sofrer modificação pós-traducional pelas prolin hidroxilases (PHDs). Uma dessas modificações é a hidroxilação da prolina, o que resulta na ligação do complexo von Hippel-Lindau (VHL) à proteína HIF1 α , e esta será levada à ubiquitinação e, posteriormente, à degradação proteossomal.

A atividade da HIF1 α é também controlada por meio da hidroxilação de um resíduo de asparagina pelo fator inibidor de HIF (FIH), que previne a interação de HIF1 α com seu coativador de transcrição p300/CBP. Tanto a PHD3 como a FIH requerem oxigênio e α -cetoglutarato como substratos, além de ferro e ascorbato como cofatores das reações. Sob condições de hipóxia, a subunidade HIF1 α é estabilizada e translocada do citoplasma para o núcleo, onde dimeriza com a subunidade HIF1 β , formando o complexo HIF-1, transcricionalmente ativo, que se associa com coativadores transcricionais e promove a expressão de mais de 100 genes, que estão relacionados à progressão tumoral (SEMENZA, 2007).

Assim que o complexo HIF-1 é ativado, as células entram no ciclo de produção de energia anaeróbico, no qual a glicose é degradada até lactato. Para que isso ocorra, HIF induz a ativação de duas formas da enzima de lactatos desidrogenases (LDH-A e LDH-5), que irá converter o piruvato em lactato, além disso, ela ativa a piruvato desidrogenase quinase 1 que irá impedir que o piruvato entre no ciclo de Krebs (CHICHE et. al., 2009).

A quebra da glicose em lactato leva a formação de metabolitos secundários como CO₂ e prótons, causando uma acidificação do meio intracelular. O meio intracelular ácido é incompatível com o crescimento celular e sobrevivência, assim para manter o pH deste meio neutro, tanto o lactato como os prótons serão transportados para o meio extracelular, através de transportadores Monocarboxilato (MCT4) e canais de Na⁺/H⁺ (NHE1), o que contribui com a acidificação do microambiente extracelular, tornando o meio intracelular mais básico (CHICHE et. al., 2009).

O CO₂ presente no meio intracelular passa por difusão para o meio extracelular e também contribui com a acidificação deste. No meio extracelular o CO₂ irá sofrer uma reação reversível de hidratação para formação de bicarbonato (HCO₃⁻), reação esta catalisada pela anidrase carbônica (CA-IX) (PASTOREKOVA et. al., 2008).

O bicarbonato é transportado para o interior da célula, por meio do transportador BT, onde se une a prótons intracelulares, produzindo H_2O e CO_2 , ajudando ainda mais a desacidificação do meio intracelular. Novamente, o CO_2 passará por difusão para o meio extracelular, a água por aquaporinas presente na membrana celular onde sofrerão nova reação de hidratação para formar bicarbonato, liberando prótons capturados no meio intracelular, acidificando ainda mais o meio extracelular (PASTOREKOVA et. al., 2008).

Desta forma, com a expressão dos reguladores de pH, tais como: transportadores de membrana, bombas e isoenzimas (Anidrases Carbônicas), o ambiente intracelular é preservado neutro, mas produzindo uma acidose no meio extracelular típica de ambientes tumorais, contribuindo para sua progressão. Nos últimos anos, HIF-1 α e CA-IX vem sendo alvo de vários estudos, pois demonstraram ser promissores marcadores de diagnóstico, prognóstico e alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos (STOLZE et al., 2006; RANKIN & GIACCIA, 2008; PASTOREKOVA et. al., 2008; VAN DEN BEUCKEN et. al., 2009; TEPPPO et. al., 2013; WARD et al., 2013).

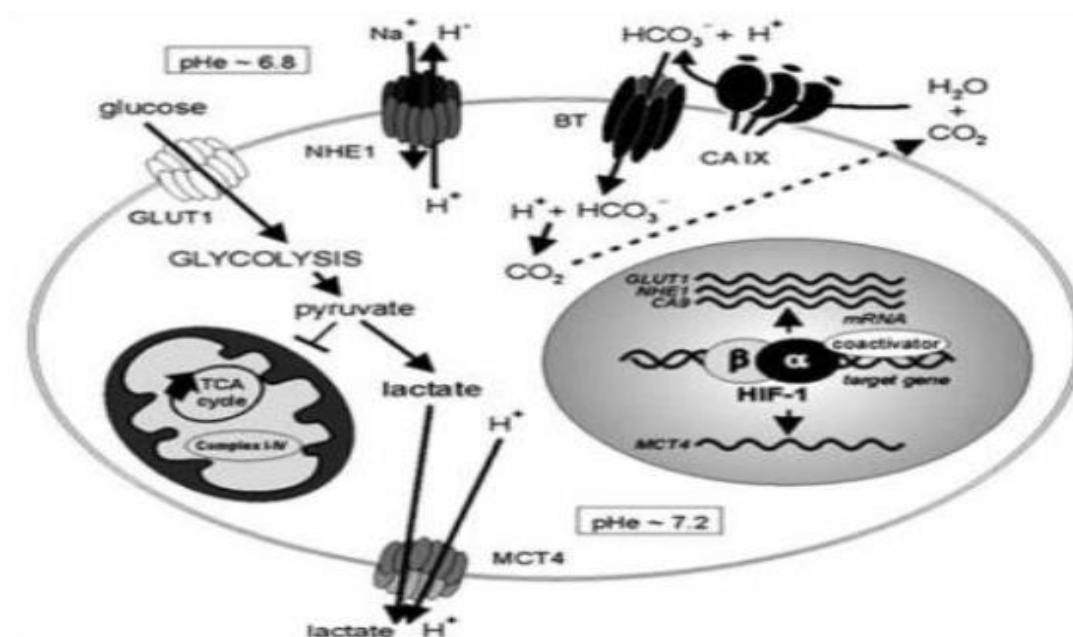


Figura 3. Processos envolvidos na via de transcrição HIF-1 para a regulação do pH em células tumorais. Fonte: PASTOREKOVA et. al., 2008.

Estudos sobre a ação da nicotina na ativação das vias de PI3K/AKT e ERK1/2, que culminam na ativação de HIF-1 α são de suma importância, para que aja um melhor entendimento da ação da nicotina em células tumorais, ajudando assim no desenvolvimento de novos fármacos e protocolos específicos para pessoas tabagistas, resultando em uma melhor resposta ao tratamento.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Analisar a expressão dos genes ERK1/2, PI3K, AKT, HIF-1 α e CA-IX em cultura celular de SCC9 e DOK expostos a diferentes concentrações de nicotina e à câmara de hipóxia em tempos variados.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar ensaio de viabilidade celular das linhagens SCC9 e DOK em meio contendo nicotina em diferentes tempos e concentrações através de ensaio de MTS para determinar as melhores concentrações e tempos;
- Cultivar SCC9 e DOK em meios contendo nicotina nas concentrações determinadas;
- Submeter as linhagens celulares SCC9 e DOK à câmara de hipóxia em tempos variados
- Avaliar a expressão dos genes ERK1/2, PI3K, AKT, HIF-1 α e CA-IX em SCC9 e DOK expostas a nicotina e hipóxia em diferentes tempos através da técnica de PCR em tempo real.

3. Metodologia

3.1. Cultura celular

As Linhagens celulares SCC9 (Derivada de Carcinoma Epidermoide de língua) e DOK (Derivada de Queratinócitos Displásicos Orais de língua) utilizadas no experimento foram doadas pelo Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP), e foram cultivadas em parceria com o Laboratório de Biologia de Células Tronco (LABITRON) da FO-USP. O experimento com hipóxia foi realizado em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP-FMUSP).

As células de SCC9 foram cultivadas em meio de cultura contendo 220mL DMEM (Sigma-Aldrich), 220mL de meio Ham-F12 (Gibco), suplementado com 50mL de soro bovino fetal, 5mL de antimicótico/antibiótico e 4mL de hidrocortizona (50ng/mL). As células de DOK foram cultivadas em meio de cultura contendo 440mL de DMEN (Sigma-Aldrich), suplementada com 50mL de soro bovino fetal, 5 ml de antimicótico/antibiótico e 5ml de hidrocortisona (5ng/mL). Os dois cultivos celulares foram mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado com auxílio de microscópio invertido, sendo o meio trocado a cada 2 dias. Quando as células atingiram 80% de confluência, o meio foi totalmente aspirado e as células lavadas com 10 ml de PBS 1x estéril, e dispostas com 5ml de tripsina a 0,05% durante 5 minutos em estufa a 37°C até o desprendimento do frasco. Após o tempo decorrido foi adicionado 5mL de meio de cultivo em cada frasco com intuito de inativar a tripsina. As células em suspensão foram transferidas para um tubo tipo Falcon, e centrifugadas a temperatura ambiente a 1000xg por 4 minutos; em seguida o sobrenadante foi aspirado e adicionado 3mL de meio de cultura específico de cada célula. As células foram ressuspensas e distribuídas em placas de Petri (P100) a uma concentração de 1×10^5 células/placa, em seguida e

foram mantidas novamente em estufa com as mesmas condições anteriores até atingirem a confluência de 80%. Após atingirem a confluência ideal os meios foram trocados e adicionados a cada placa meios contendo nicotina (Nicotine $\geq 99\%$ - Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0,1mM, 1mM, 2,5mM, 5mM e 10mM, sendo separadas em grupos de 8 e 24 horas de exposição. As células que foram submetidas a câmara de hipóxia não receberam tratamento com nicotina, e foram expostas a uma atmosfera de 94% nitrogênio, 5% CO₂ e 1% de oxigênio em estufa de cultura a 37°C, separado em grupos de 8 e 24 horas.

3.2 Ensaio de Viabilidade Celular

Para a análise de viabilidade celular as células foram cultivadas em placa de 96 poços expostas a diferentes concentrações de nicotina (Nicotine $\geq 99\%$ - Sigma), 0 mM, 0,1 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, por tempos variados de 8 e 24h. Decorrido o tempo de exposição, a viabilidade celular foi analisada por meio do método colorimétrico baseado na biorredução do composto tetrazólio [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio], com sal interno (MTS) (Promega #G3580).

A absorbância foi lida em leitor de microplacas ELx800™ (Bio-Tek Instruments, Winooski) no comprimento de onda de 490 nm usando como grupo controle células não expostas a nicotina.

3.3 Extração de RNA e análise da integridade

A extração de RNA das células cultivadas foi realizada com Trizol® (Invitrogen™) seguindo protocolo do fabricante.

Para a extração de RNA das culturas celulares, o meio de cultura foi totalmente aspirado das placas e estas foram incubadas com 1,5 ml de Trizol® (Invitrogen™) por 5 minutos.

Após a lise celular, as células foram coletadas e transferidas para tubos de microcentrifuga de polipropileno livres de RNase e DNase, adicionando-se a cada amostra 300µL de clorofórmio. Os tubos foram centrifugados a 10.200 rpm durante 15 min à 4°C, e em sequência a fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para novos tubos de microcentrifuga. Foi adicionado 750µL de álcool isopropílico, e os mesmos foram centrifugados a 10.200 rpm durante 10 min à 4°C. Descartou-se o sobrenadante, e foi adicionado 1 ml de álcool 75% gelado. Os tubos foram centrifugados a 8.400 rpm durante 5 min. O álcool foi descartado e o RNA foi ressuspensionado em 20µL de água livre de DNase e RNase.

O RNA extraído foi avaliado quanto a sua qualidade (260 e 280 nm) e concentração em aparelho NanoDrop™ 2000/2000c. Para análise da integridade do RNA ribossomal 18S e 28S, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.4 Tratamento e Síntese de cDNA

As amostras foram previamente tratadas com DNase I (Invitrogen™), em seguida

foram utilizadas para síntese de cDNA. A síntese foi realizada a partir de 1µg de RNA utilizando Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor (Life Technologies™), seguindo protocolo proposto pelo fabricante.

3.5 PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizado utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies™), com um volume final de 10µL para cada reação. Os Primers utilizados na reação encontram-se na Tabela 1. As reações de amplificação foram realizadas em triplicadas no termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os níveis de transcritos foram normalizados em relação ao controle endógeno B2M (Beta-2-Microglobulina), sendo em seguida corrigidos em relação ao grupo controle (0mM) de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1. Sequência dos primer qPCR.

GENE	Primer	Pares de Base
AKT1	F:AGATCCTCAAGAAGGAAGTC R:TCTGGAAAGAGTACTTCAGG	120
PI3KCA	F:GCTTTCTGTCTCCTCTAAAC R:CAGAGGACATAATTCGACAC	75
ERK1	F:CGAAACTACCTACAGTCTCT R:GGGTAAAGGTTAACATCCG	113
ERK2	F:TACAGGGCTCCAGAAATTA R:CAGCCTACAGACCAAATATC	71
HIF-1α	F:TTCAAGCAGTAGGAATTGGAAC R:CGTTTCCAAGAAAGTGATGTAGTAG	115
CA-IX	F:GACATCCTAGCCCTGGTTTT R:CCTTTGGTTCCCCTTCTGTG	74
B2M	F:ACTTTGTCACAGCCCAAGAT R:CCAAATGCGGCATCTTCAAA	80

3.6 Analise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad[®] v.7.00 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). As diferenças entre o grupo controle e tratados foram avaliadas utilizando a análise de variância one-way (Teste Tukey) e para ensaio de viabilidade (MTS) análise de variância one-way (Dunnett's) . Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Viabilidade celular

Para determinação das concentrações ideais de estudo, foram realizados ensaios de MTS para verificação da viabilidade celular de SCC9 e DOK submetidas a concentrações crescentes de nicotina (0,1mM, 1mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM e 30mM) em tempos de exposição de 8 e 24 horas (figura 4).

Os resultados obtidos de SCC9/8horas (figura 4A), demonstraram uma diferença significativa na viabilidade celular nas concentrações de 1mM, 2,5mM e 30mM; quando comparado ao controle. Sob a concentração de 1mM e 2,5mM foram observados o aumento da viabilidade celular em 87% e 96%, respectivamente. Enquanto na concentração de 30mM foi observado diminuição de 94% na viabilidade celular.

Diferença significativa em relação ao controle foi observada para as concentrações de 20mM e 30 mM em SCC9/24horas (Figura 4 B). Em concentração de 20mM ocorreu redução de 68% da viabilidade; ao passo que não houve detecção de viabilidade celular em 30mM.

Não foi encontrada diferença significativa na viabilidade celular de DOK/8horas (figura 4C) nas concentrações crescentes de nicotina em relação ao controle. Já em DOK/24horas (figura 4D) houve diferenças significativas entre o controle e as concentrações de 2,5mM, 20mm e 30mM. Redução de 68% na viabilidade celular foi observada para a concentração de 2,5mM, contudo nas concentrações de 20mM e 30mM não houve detecção da viabilidade celular.

Analisando os resultados obtidos, percebe-se que as células expostas às concentrações de 0,1 à 10mM possuem uma maior viabilidade celular quando

comparada com as concentrações de 20mM e 30mM. Mediante a isso, foram selecionadas para estudo de expressão gênica as concentrações de 0,1 à 10mM.

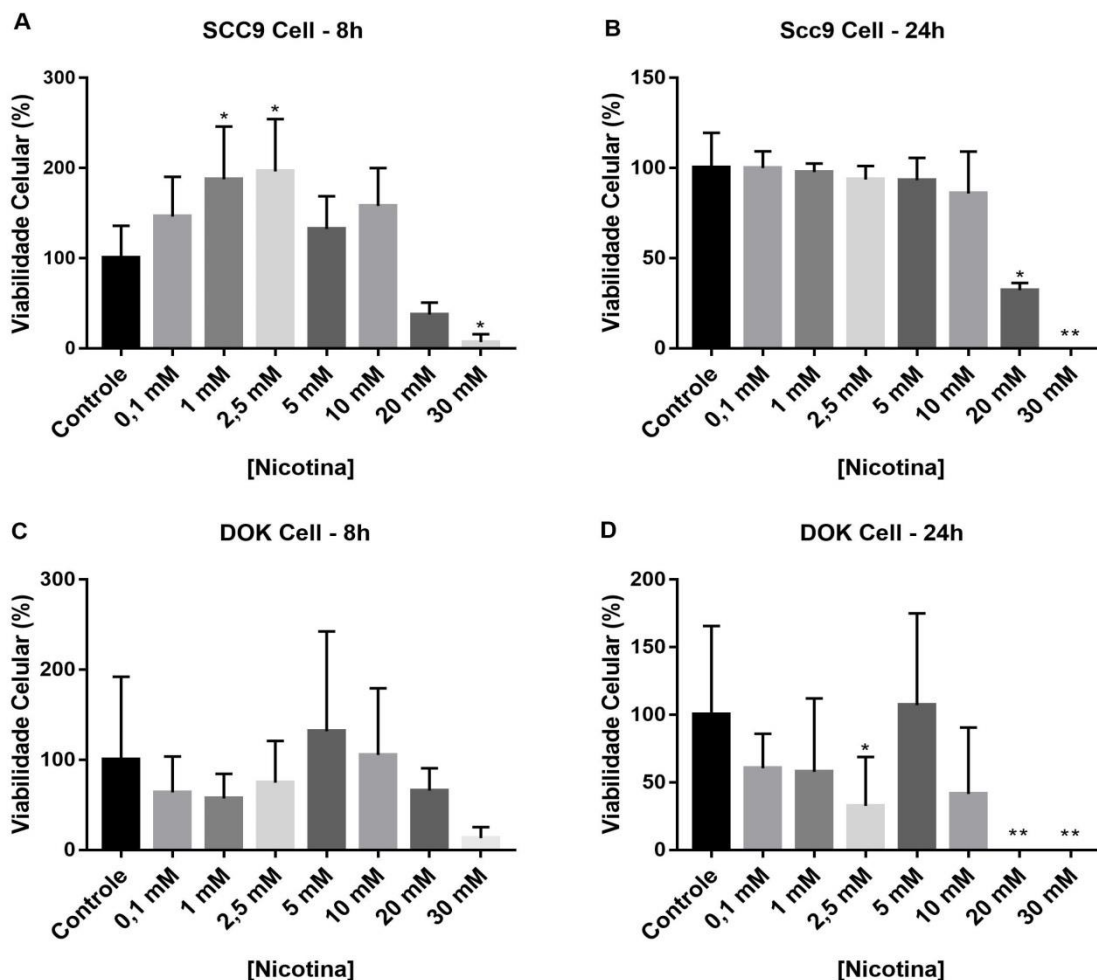


Figura 4. Viabilidade celular de SCC9 e DOK. (A) SCC9 expostas à diferentes concentrações de nicotina, nos tempos de 8 e (B) 24 horas através do teste de MTS. (C) DOK expostas à diferentes concentrações de nicotina, nos tempos de 8 e (D) 24 horas através do teste de MTS *p < 0,05 comparado com o controle. ** não apresentaram viabilidade celular quando comparado ao controle. Os dados são representativos de três experimentos independentes, e as reações foram preparadas em triplicatas, sendo os valores expressos como média ± desvio padrão.

4.2. Efeito da nicotina na expressão do gene HIF-1 α em SCC9 e DOK.

4.2.1. SCC9

Conforme a figura 5A, os níveis de expressão do gene HIF-1 α em SCC9/8horas em crescentes concentrações de nicotina e exposição à câmara de hipóxia; foram significativamente menores que a expressão observada no controle.

Observou-se que a expressão de HIF-1 α em SCC9/8horas foi significativamente maior nas concentrações crescentes de nicotina quando comparado com câmara de hipóxia (figura 5A). Encontrando-se nas concentrações de 0,1mM, 1mM, 2,5mM e 5mM um aumento na expressão de 2,5; 2,4; 2,4 e 1,8 vezes, respectivamente.

Com relação ao tempo de 24 horas (Figura 5B), foi observada uma maior expressão de HIF-1 α em câmara de hipóxia (2,2 vezes), e nas concentrações de 0,1mM (11 vezes) e 2,5mM (1,4 vezes), em relação ao controle. No entanto, em 10mM foi observado expressão 1,5 vezes menor que o controle.

Comparando câmara de hipóxia 24 horas (figura 5B) às demais concentrações, observou-se uma diferença significativa em todas as concentrações. Na concentração de 0,1mM observou-se expressão 5 vezes maior que a da câmara de hipóxia. Nas demais concentrações as expressões foram menores em relação a câmara de hipóxia.

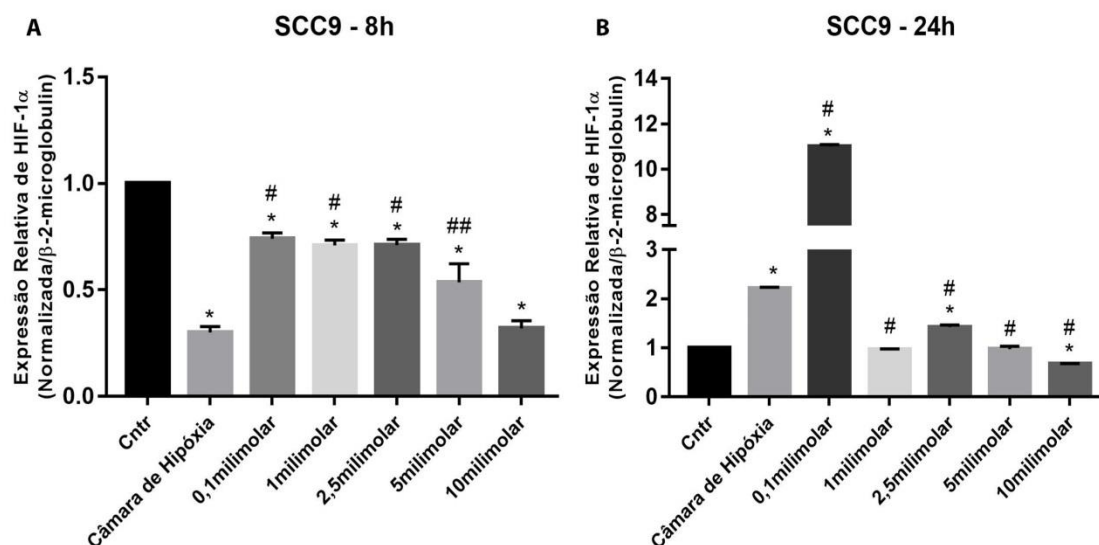


Figura 5. Expressão de HIF-1α em SCC9. A) Expressão relativa de HIF-1α em SCC9 após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Diferem do controle ($p < 0,0001$). # Diferem da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). ## Diferem da câmara de hipóxia ($p = 0,0001$). B) Expressão relativa de HIF-1α SCC9 após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Diferem do controle ($p < 0,0001$). # Diferem da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$).

4.2.2. DOK

Os níveis de expressão do gene HIF-1α em DOK, quando exposta à concentrações crescentes de nicotina e câmara de hipóxia em um período de 8 horas (figura 6A), foi menor em câmara de hipóxia (1,5 vezes), 1mM (1,3 vezes), 2,5mM (1,1 vezes) e 10mM (1,2 vezes) em relação ao controle. No entanto foi observado que em 5mM a expressão foi 1,2 vezes maior que o controle.

Quando comparado a expressão em câmara de hipóxia em 8 horas (figura 6A) com as demais concentrações de nicotina, observou-se uma maior expressão nas concentrações de 0,1mM (1,54 vezes), 1mM (1,2 vezes), 2,5mM (1,4 vezes), 5mM (1,8 vezes) e 10mM (1,3 vezes).

Para os níveis de expressão gênica de HIF-1 α em DOK no período de 24 horas (figura 6B), houve uma menor expressão nas concentrações de 0,1mM (1,7 vezes), 2,5mM (2,11 vezes), 5mM (2,33 vezes) e 10mM (3,57 vezes) quando comparado ao controle.

A expressão em câmara de hipóxia no tempo de 24 horas (figura 6B), foi aproximadamente 4 vezes maior que o controle em relação a HIF-1 α . Com relação à expressão nas concentrações de nicotina, observou-se uma menor expressão de HIF-1 α em todas as concentrações em relação a câmara de hipóxia.

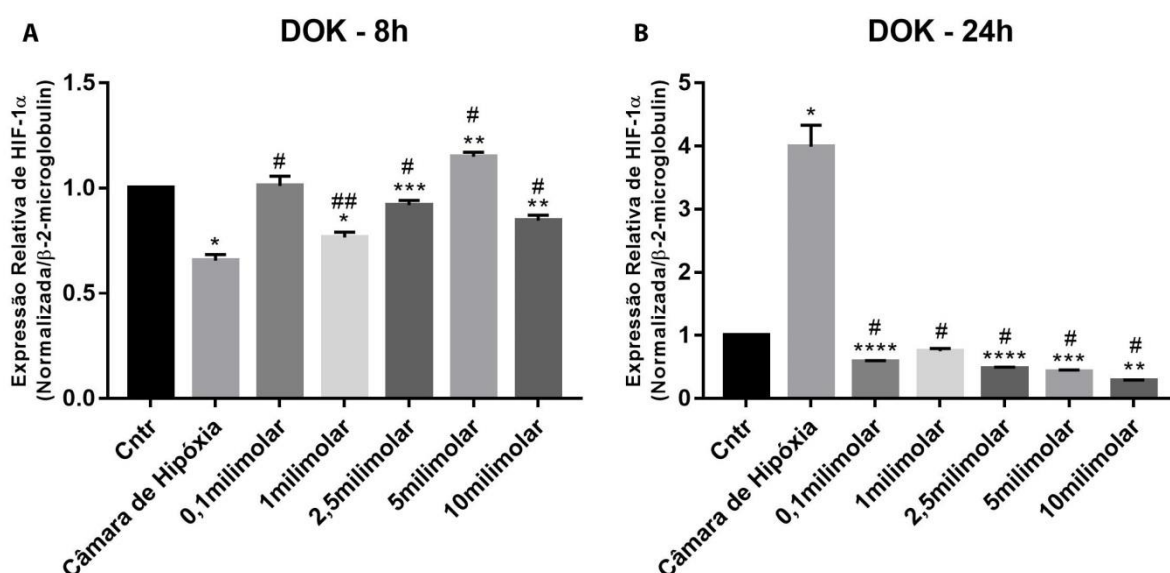


Figura 6. Expressão de HIF-1 α em DOK. A) Expressão relativa de HIF-1 α em DOK após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,0005$). *** Difere do controle ($p < 0,05$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). ## Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,05$). B) Expressão relativa de HIF-1 α DOK após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,0005$). *** Difere do controle ($p < 0,001$). **** Difere do controle ($p < 0,05$).

4.3. Efeito da nicotina na expressão dos genes PI3K e AKT.

4.3.1. SCC9

A expressão gênica de PI3K em SCC9/8 horas (figura 7A), foi significativamente menor em câmara de hipóxia (1,5 vezes), e nas concentrações de nicotina de 0,1mM (1,6 vezes), 1mM (1,2 vezes), 2,5mM (1,8 vezes), 5mM (1,5 vezes) e 10mM (5,2 vezes) em relação a expressão do controle.

Com relação a expressão de PI3K, quando comparado câmara de hipóxia às demais concentrações de nicotina no período de 8 horas (figura 7A), observou-se expressões significativas nas concentrações de 1mM, 2,5mM e 10mM. Em 1mM a expressão foi aproximadamente 1,3 vezes maior. Já para 2,5mM e 10mM observou-se uma expressão 1,2 vezes e 3,4 vezes menor em comparação a câmara de hipóxia.

A expressão de PI3K em SCC9/24 horas (figura 7B), foi significativamente maior que o controle em câmara de hipóxia, 0,1mM, 2,5mM e 5mM, com respectivas expressões aumentadas em 12 vezes, 37 vezes, 4 vezes e 2,4 vezes.

Em relação à comparação entre a expressão proveniente da câmara de hipóxia e as concentrações de nicotina no tempo de 24 horas (figura 7B), foi observado uma expressão 3 vezes maior em 0,1mM. A expressão foi 6 vezes menor nas concentrações de 1mM e 5mM. Já na concentração de 2,5mM e 10 mM a expressão foi, respectivamente, 3 e 12 vezes menor em relação a câmara de hipóxia.

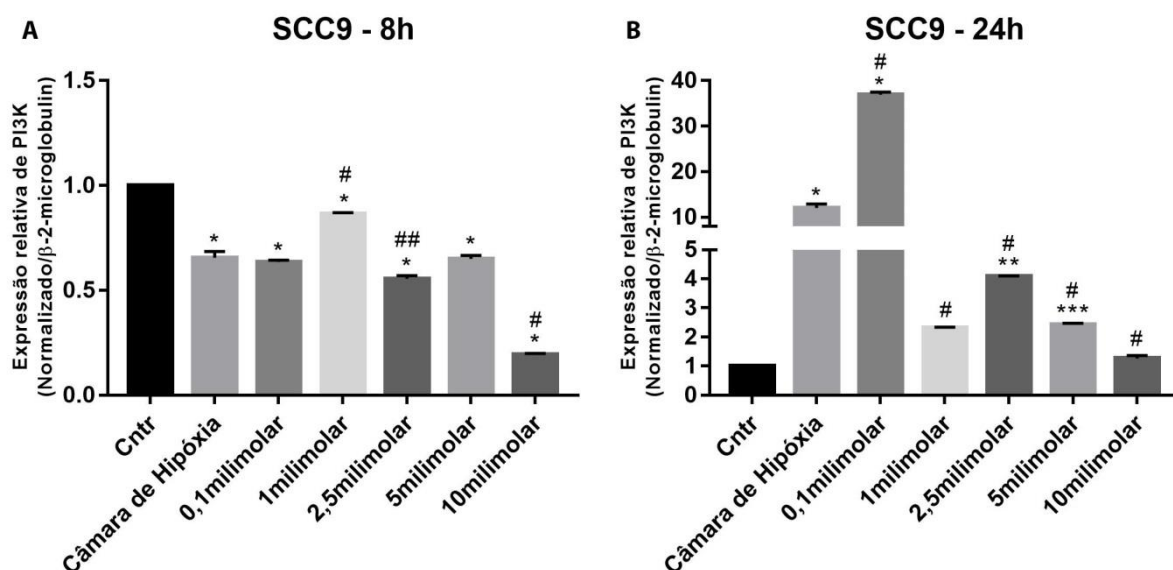


Figura 7. Expressão de PI3KCA em SCC9. A) Expressão relativa de PI3K em SCC9 após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). ## Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0005$). B) Expressão relativa de PI3K em SCC9 após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,0005$). *** Difere do controle ($p < 0,05$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$).

O efeito da câmara de hipóxia e da nicotina nas diferentes concentrações, sob a expressão do gene AKT em SCC9/8horas (figura 8A) em relação ao controle, mostrou-se significativamente menor. No entanto quando a comparação é feita entre câmara de hipóxia e as demais concentrações, foi observado expressão significativamente maior em 0,1mM (1,3 vezes), 1mM (1,8 vezes), 2,5mM (1,2 vezes) e em 5mM (1,4 vezes) e menor em 10mM (1,8 vezes), em relação a câmara de hipóxia.

A figura 8B representa a expressão de AKT em SCC9 no tempo de 24 horas. Observou-se expressão significativamente maior em relação ao controle em câmara de hipóxia (1,4 vezes), 0,1mM (5,4 vezes), 1mM (1,2 vezes), 2,5mM (2 vezes) e 5mM (1,1 vezes).

Quando comparado a expressão em câmara de hipóxia com as concentrações de nicotina, foi observado uma expressão 3,8 vezes maior na concentração de 0,1mM e de 1,2 vezes em 2,5mM.

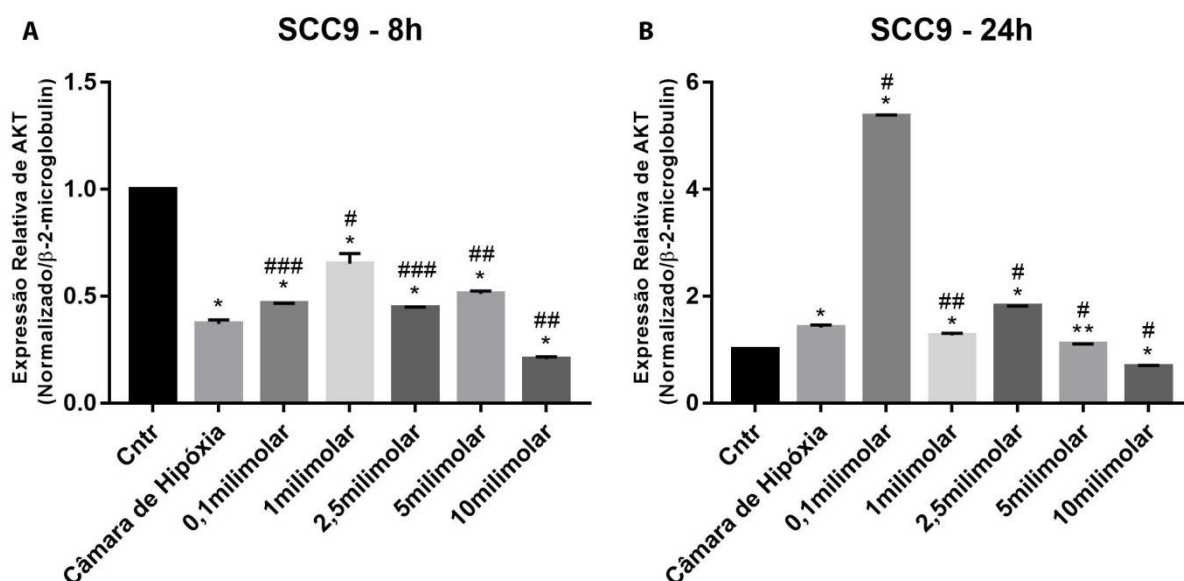


Figura 8. Expressão de AKT1 em SCC9. A) Expressão relativa de AKT em SCC9 após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). # Difere de câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). ## Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,005$). ### Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,05$). B) Expressão relativa de AKT em SCC9 após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,05$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). ## Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,001$).

4.3.2. DOK

Para DOK, os níveis de expressão de PI3K em 8 e 24 horas (figura 9A e B), foram 2 e 12 vezes maior em câmara de hipóxia com relação ao controle. Comparando câmara de hipóxia com as concentrações de nicotina no tempo de 8 e 24 horas, as expressões foram em média 2 à 20 vezes menor.

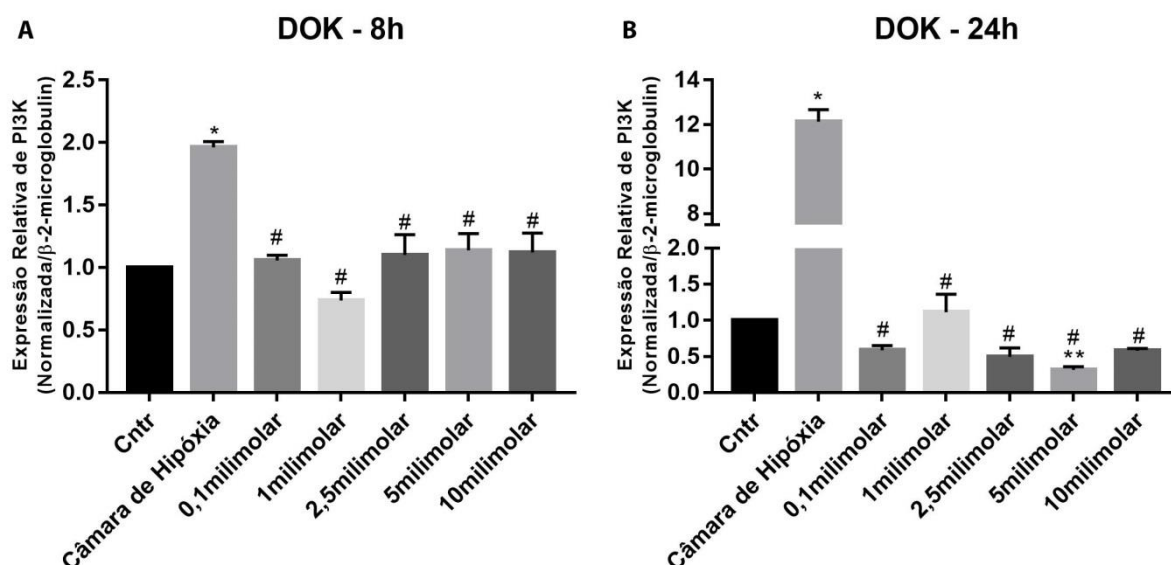


Figura 9. Expressão de PI3KCA em DOK. A) Expressão relativa de PI3K em DOK após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). B) Expressão relativa de PI3K em DOK após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,05$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$).

A expressão de AKT no tempo de 8 horas (figura 10A), foi significativamente maior em câmara de hipóxia (5 vezes) e 2,5mM (2 vezes) em relação ao controle. No entanto quando comparamos câmara de hipóxia com as demais concentrações de nicotina, observou-se uma expressão média 5 vezes menor nas concentrações de nicotina.

No tempo de 24 horas (figura 10B), apenas câmara de hipóxia apresentou expressão alterada, sendo essa 22 vezes maior que a apresentada pelo controle. Observou-se uma expressão média 33 vezes menor nas concentrações de nicotina em relação a câmara de hipóxia.

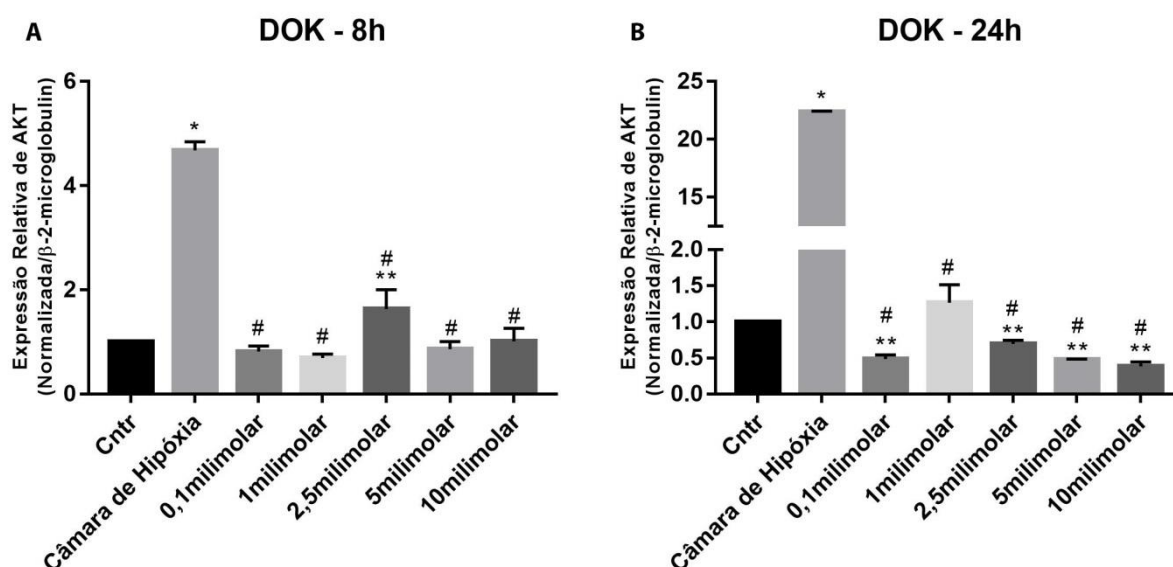


Figura 10. Expressão de AKT1 em DOK. A) Expressão relativa de AKT em DOK após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,05$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). B) Expressão relativa de AKT em DOK após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$).

4.4. Efeito da nicotina na expressão dos genes ERK1/2.

4.4.1. SCC9

Os efeitos dos tratamentos na expressão de ERK1 em SCC9 no tempo de 8 horas (figura 11A) foram significativamente menores que o controle, o mesmo pode ser observado quando comparado câmara de hipóxia com as concentrações de nicotina.

No tempo de 24 horas (figura 1B), ocorreu aumento na expressão de câmara de hipóxia em 35 vezes, aumento na expressão em 0,1mM de 50 vezes e na

concentração de 2,5mM o aumento foi de 4 vezes, quando comparado a expressão do controle. Com relação a expressão de câmara de hipóxia com as concentrações de nicotina, a expressão foi 1,5 vezes maior em 0,1mM. Nas concentrações de 1mM, 2,5mM, 5mM e 10mM, a expressão foi 14, 9, 20 e 58 vezes menor em relação a câmara de hipóxia.

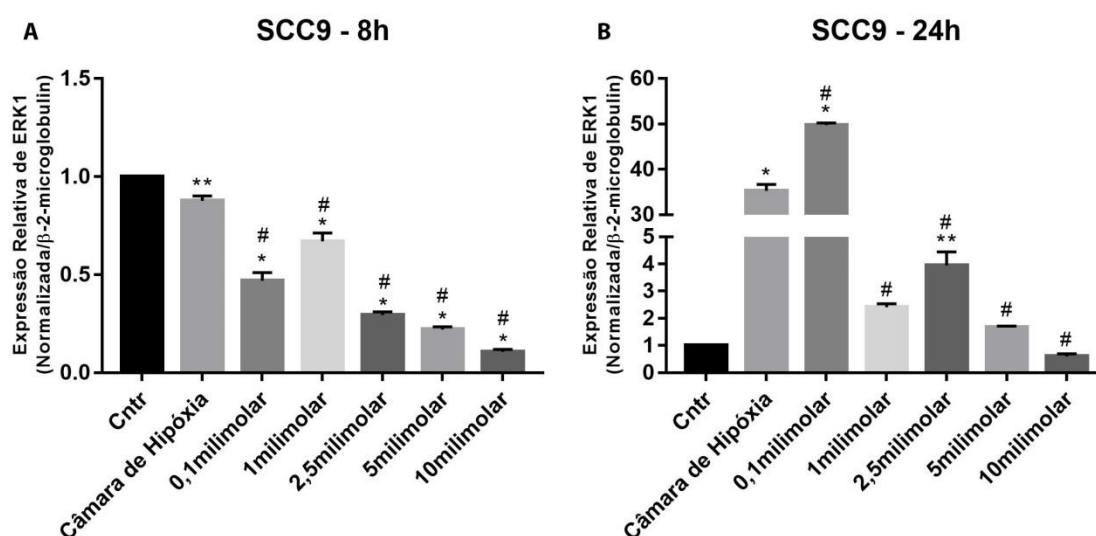


Figura 11. Expressão de ERK1 em SCC9. Figura 11. A) Expressão relativa de ERK1 em SCC9 após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). B) Expressão relativa de ERK1 em SCC9 após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$).

Em relação à expressão do gene ERK2 em SCC9/8horas (figura 12A), todos os tratamentos foram significativamente menor que o controle. Em relação à câmara de hipóxia com as demais concentrações de nicotina, apenas 1mM apresentou uma expressão de 1,3 vezes maior que o de câmara de hipóxia.

No tempo de 24 horas (figura 12B) observou expressão significativamente maior em câmara de hipóxia (5 vezes) e 0,1mM (13 vezes) em relação ao controle.

A comparação entre a expressão da câmara de hipóxia com as concentrações de nicotina, mostrou que em 0,1mM ocorreu expressão 3 vezes maior. Para as demais concentrações de 1mM, 2,5mM, 5mM e 10mM, a expressão ficou em média 3 vezes menor que câmara de hipóxia.

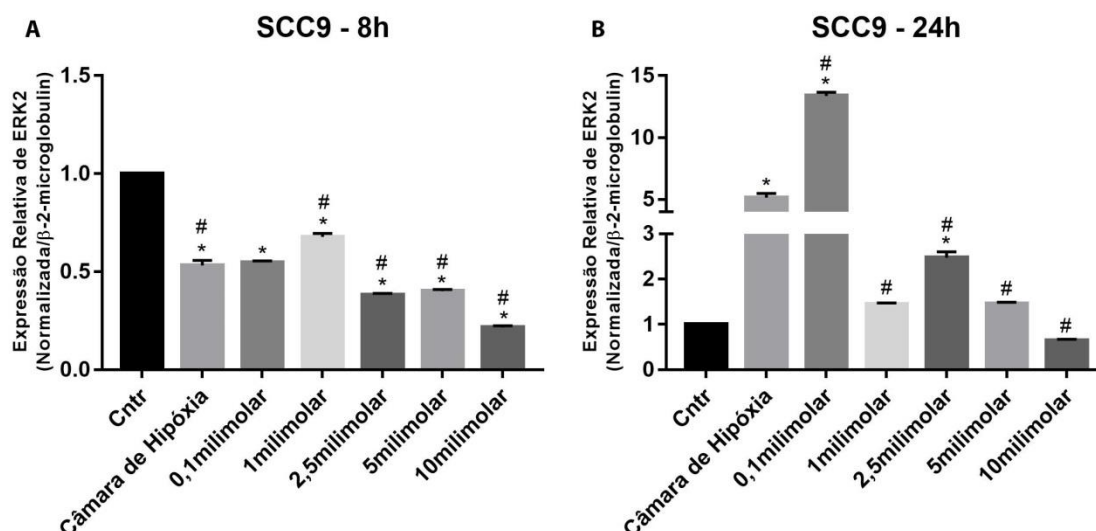


Figura 12. Expressão de ERK2 em SCC9. A) Expressão relativa de ERK2 em SCC9 após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). B) Expressão relativa de ERK2 em SCC9 após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$).

4.4.2. DOK

A expressão relativa do gene ERK1 em DOK/8horas (figura13A), foi significativamente maior em câmara de hipóxia (1,7 vezes) e 0,1mM (1,3 vezes) quando comparado ao controle. No entanto, a comparação entre câmara de hipóxia e concentrações de nicotina, mostrou que a expressão em câmara de hipóxia é significativamente maior que as concentrações de nicotina

No tempo de 24 horas (figura 13B) câmara de hipóxia apresentou expressão 17 vezes maior em relação ao controle. Foi observado menor expressão de ERK1 nas concentrações de nicotina de 5mM (2 vezes) e 10mM (6 vezes) em relação ao controle.

Quando comparado a expressão de câmara de hipóxia com as concentrações de nicotina, observou-se expressão média menor (23 vezes) nas concentrações de nicotina

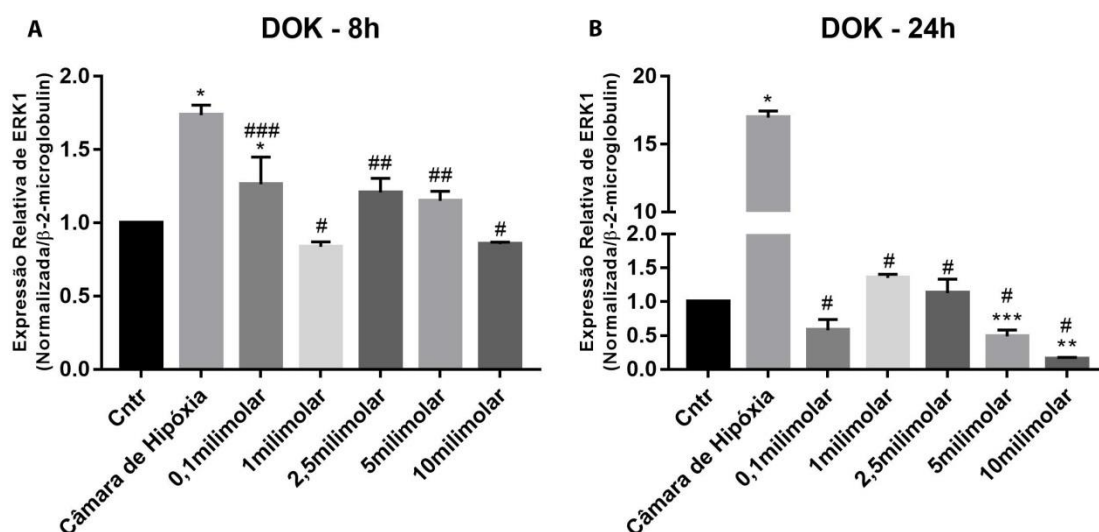


Figura 13. Expressão de ERK1 em DOK. A) Expressão relativa de ERK1 em DOK após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). ## Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0005$). ### Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,001$). B) Expressão relativa de ERK1 em DOK após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,001$). *** Difere do controle ($p < 0,05$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$).

Em relação à expressão de ERK2 na linhagem celular de DOK/ 8 horas (figura 14A) foi observado diferença significativa em câmara de hipóxia e 1mM comparado ao controle. Em câmara de hipóxia houve expressão de aproximadamente 1,3 vezes maior em relação ao controle, já em 1mM essa expressão foi 1,3 vezes menor.

Comparando a expressão em câmara de hipóxia com as demais concentrações de nicotina, a expressão foi 1,5 e 1,7 vezes menor nas concentrações de 0,1mM e 1mM.

No tempo de 24 horas (figura 14B), a expressão de ERK2, em câmara de hipóxia foi aproximadamente 8 vezes maior em relação ao controle. Em relação a concentração de nicotina de 1mM a expressão foi 1,3 vezes maior que o controle.

A comparação da expressão entre câmara de hipóxia e as demais concentrações de nicotina, mostrou expressão média 11 vezes menor das concentrações de nicotina em relação a câmara de hipóxia.

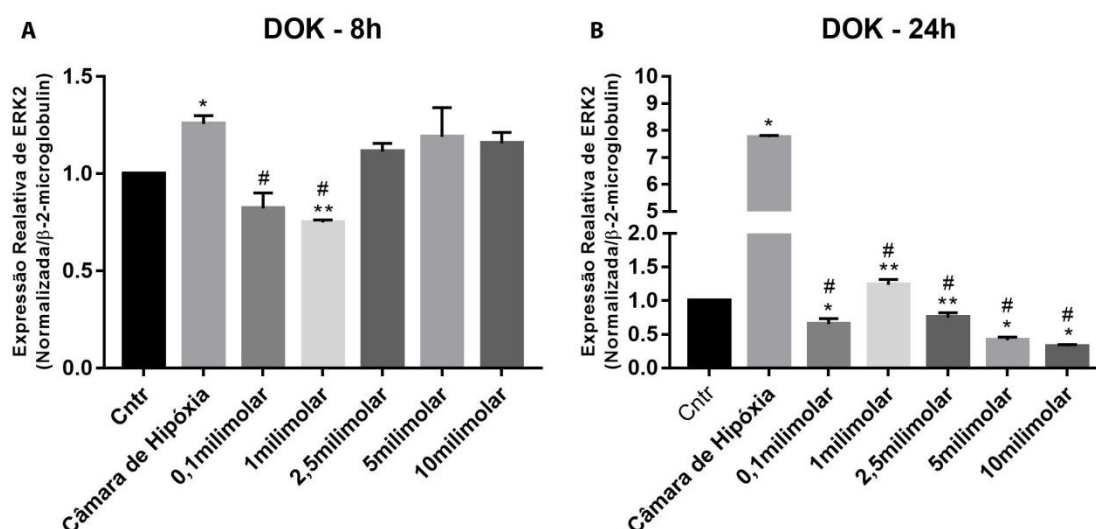


Figura 14. Expressão de ERK2 em DOK. A) Expressão relativa de ERK2 em DOK após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,05$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). B) Expressão relativa de ERK2 em DOK após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$).

4.5. Efeito da nicotina na expressão dos genes CA-IX.

4.5.1. SCC9

No tempo de 8 horas (figura 15A) a expressão de CA-IX foi significativamente maior em câmara de hipóxia (~5 vezes) em relação ao controle. Quando comparado câmara de hipóxia às demais concentrações de nicotina, observou-se uma expressão em média 8 vezes menor nas concentrações de nicotina.

Em 24 horas (figura 15B), observou-se uma expressão significativamente maior em câmara de hipóxia (1750 vezes) e 0,1mM (153 vezes) em relação ao controle. Comparando as concentrações de nicotina com câmara de hipóxia, a expressão de CA-IX foi menor em todas as concentrações de nicotina testadas

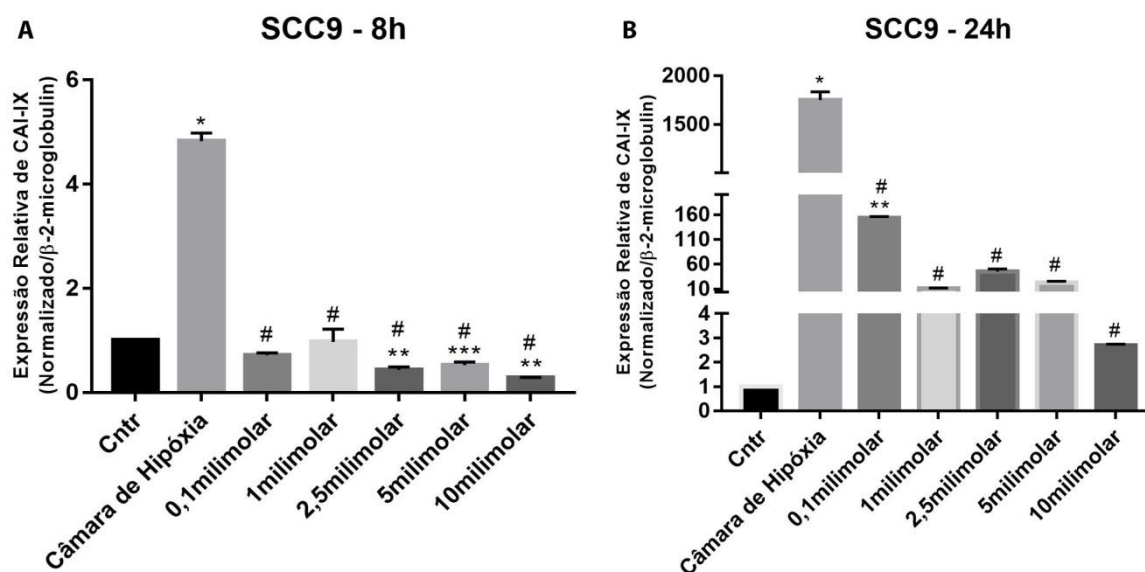


Figura 15. Expressão de CA-IX em SCC9. A) Expressão relativa de CA-IX em SCC9 após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,001$). *** Difere do controle ($p < 0,05$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). B) Expressão relativa de CA-IX em SCC9 após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). ** Difere do controle ($p < 0,001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$).

4.5.2. DOK

A expressão de CA-IX em DOK tanto em 8 horas como em 24 horas (figura 16A e B), foi significativamente maior em câmara de hipóxia, com expressão 37 e 758 vezes maior que o controle. No entanto quando comparamos as concentrações de nicotina com câmara de hipóxia no tempo de 8 e 24 horas, observamos que as expressões médias nas concentrações de nicotina foram de aproximadamente 33 e 200 vezes menor em relação a câmara de hipóxia.

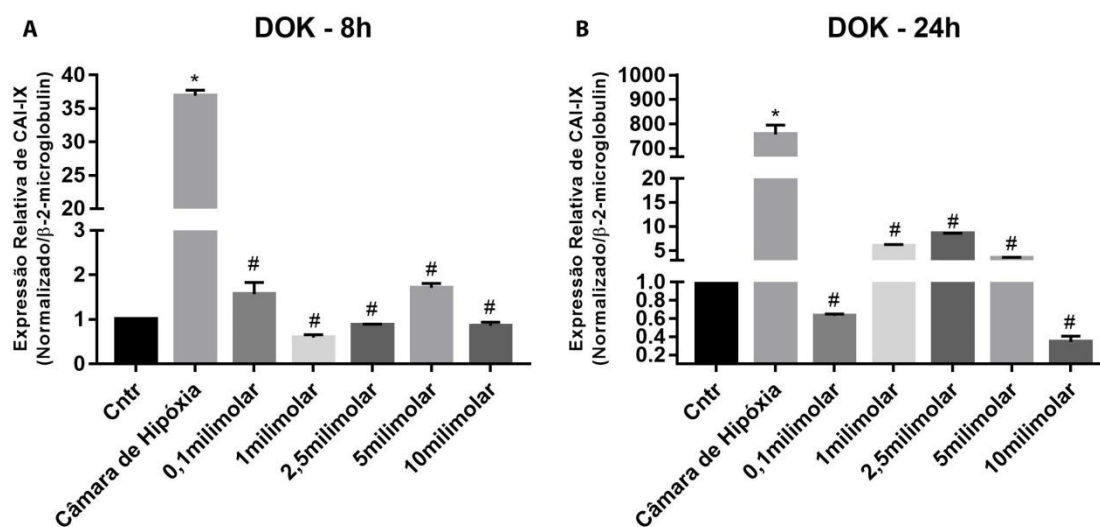


Figura 16. Expressão de CA-IX em DOK. A) Expressão relativa de CA-IX em DOK após 8 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$). # Difere da câmara de hipóxia ($p < 0,0001$). B) Expressão relativa de CA-IX em DOK após 24 horas de exposição à câmara de hipóxia e a concentrações crescentes de nicotina. * Difere do controle ($p < 0,0001$).

5. Discussão

A nicotina é o maior componente presente no cigarro, e seu papel no organismo vai além da dependência ao tabaco, contribuindo também para estimulação da progressão de células tumorais. A ação de estimulador da progressão está diretamente relacionada a capacidade da nicotina em se ligar com grande afinidade aos receptores nAChRs ativando assim vias de PI3K/AKT, ERK1/2 e HIF-1 α , acarretando uma mudança de fenótipo das células tumorais que leva a inibição da apoptose, aumento da proliferação celular e metástase (ARREDONDO et al., 2006; MACHA et al., 2011; SINGH et. al., 2011).

Estudos demonstram que a ligação da nicotina com o receptores nAChR mimetiza uma falsa situação de hipóxia, devido o acúmulo ROS e produção de fatores de crescimento celular que leva a transativação de vias mitogênicas e antiapoptóticas, culminando no aumento da síntese proteica de HIF-1 α . Evidências demonstram o papel principal da ativação da via HIF-1 α como um passo crítico na tumorigênese devido à sua ligação a várias vias oncogênicas e de genes supressores de tumores (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004; GUO et al., 2012; SCHAAL; CHELLAPPAN, 2014).

A expressão de HIF- 1 α em SCC9 no tempo de 8 horas, nos tratamentos com nicotina e em câmara de hipóxia, foram menores que no controle. No entanto, nas concentrações de 0,1mM, 1mM, 2,5mM e 5mM de nicotina mostraram uma maior expressão em relação a câmara de hipóxia. Em relação à expressão de HIF-1 α em SCC9 no tempo de 24 horas, foi observado uma maior expressão na concentração de 0,1mM de nicotina (11 vezes) em relação ao controle; e 5 vezes maior que em câmara de hipóxia.

Estudo realizado por DAIJO et. al. (2016) demonstrou que existe uma modulação positiva da expressão de mRNA de HIF-1 α quando exposto a extrato de cigarro e nicotina; no mesmo estudo foi observado que a expressão de mRNA de HIF-1 α no tratamento com extrato de cigarro foi maior que em hipóxia induzida em câmara. SHI et. al. (2012) observou que a expressão de HIF-1 α era menor nas células expostas à

nicotina que no controle no tempo de 8 horas, além disso, essa expressão sofre um aumento significativo em relação ao controle no tempo de 16 à 30 horas de exposição à nicotina.

ZHANG et. al. (2007) e SHI et. al. (2012) demonstraram que a nicotina promove o acúmulo de proteína de HIF-1 α em câncer de pulmão e nasofaringe de forma dose/tempo dependente e que esse acúmulo de proteína é revertido quando se realiza o bloqueio do transcrito de HIF-1 α com siRNA específico, demonstrando que nesse caso a expressão de mRNA de HIF-1 α está inteiramente ligada ao aumento da expressão de sua proteína. A ativação da proteína HIF-1 α está diretamente ligado ao aumento da expressão de genes ligados ao metabolismo da glicose, proliferação celular, migração e angiogênese. Mediante aos achados é possível sugerir que o aumento na expressão de mRNA de HIF-1 α em nosso estudo no tempo de 24 horas na concentração de nicotina de 0,1mM, possa estar diretamente ligado ao aumento da expressão e da ativação de proteína de HIF-1 α em SCC9, contribuindo para o ganho de um fenótipo favorável para o estabelecimento das células tumorais.

A exposição à nicotina leva a ativação de uma importante via de sinalização associado diretamente ao câncer, a via PI3K/AKT. Esta via possui um papel fundamental na regulação de processos celulares, tais como a progressão do ciclo celular e sobrevivência (MARTINDALE & HOLBROOK, 2002).

Em relação à expressão gênica de PI3K em SCC9, foi observada em nosso estudo uma maior expressão no tempo de 24 horas na concentração de 0,1mM de nicotina, em relação ao controle e a câmara de hipóxia. A utilização de siRNA para subunidade de p100- α (subunidade de PI3KCA) em linhagem de câncer de ovário e de carcinoma de língua, demonstrou capacidade em diminuir a expressão e ativação da proteína PI3KCA, acompanhado da diminuição na ativação da proteína HIF-1 α e de um de seus transcritos, o VEGF, desencadeando uma menor vascularização e crescimento do tumor, aumentando apoptose e uma diminuição da invasão tumoral (metástase) (XIA et. al 2006; CHEN et. al 2011).

Mutações frequentes em PI3K e no supressor de tumor PTEN, resultam em elevada atividade da via de sinalização de PI3K/AKT através da estimulação de RTK's,

forneendo fortes evidências do papel de PI3K no desenvolvimento do câncer (CHALHOUB; BAKER, 2009). A exposição da linhagem celular NIH 3T3 H_2O_2 , um tipo de ROS, resulta na inativação de PTEN de modo dependente do tempo e da concentração de H_2O_2 , mas que essa inativação é revertida, assim que o nível de H_2O_2 diminuía no interior celular (LEE et. al., 2002). A inativação de PTEN e a estimulação de RTK é um importante passo na ativação da via de PI3K/AKT. Assim, a nicotina está diretamente ligada a expressão gênica de PI3KCA, e ao aumento da produção e ativação da proteína PI3KCA, culminando na ativação de outros fatores responsáveis pela proliferação celular e sobrevivência de células tumorais, através da regulação da via de PI3K/AKT.

Uma importante via da expressão gênica de AKT é a quinase JAK2. Ela regula a proteína STAT3, uma transdutora de sinal e ativadora de transcrição. Após sofrer fosforilação, a STAT3 é translocada para o núcleo para ativar as expressões de genes como, por exemplo, o gene responsável pela AKT. Esta via é especialmente regulada por ROS. A via de transcrição de AKT ainda não é muito bem conhecida (ZHANG et al., 2013). No presente trabalho foi observado aumento na expressão de AKT em SCC9, quando exposto a concentração 0,1mM de nicotina no tempo de 24 horas em relação ao controle e a câmara de hipóxia. A expressão de AKT está diretamente ligada ao tratamento com cisplatina, no qual o mesmo leva a produção de ROS no interior da célula (Zhang et. al. 2013). Além disso, foi relatado que a formação de ROS pode ser causada pela ligação da nicotina a nAChRs (Guo et. al. 2012). Diante desses fatos é possível sugerir que a nicotina possa estar influenciando a expressão de AKT por regulação de ROS e ativação da via JAK2/STAT3.

A ativação da via ERK/MAPK promove a fosforilação e ativação constitutiva de ERK1/2, contribuindo assim na proliferação e progressão tumoral em muitas células cancerígenas incluindo o CECP (MAGGIONI et al., 2011). Em linhagem celular de pâncreas foi observado aumento na fosforilação de ERK1/2 dose dependente, atingindo um pico de fosforilação em 0,1mM de nicotina no tempo de três minutos de exposição; além disso, foi visto que os níveis basais de ERK1/2 não fosforilada não foi alterado em relação ao controle e o tratamento com nicotina (BOSE et al. 2005). Si et al. (2012) observou em linhagem de célula de osteosarcoma, quando tratado com siRNA para ERK1/2, uma diminuição do nível de expressão gênica e proteica

de ERK1/2, conseqüentemente houve uma diminuição no crescimento e invasão das células tumorais, uma diminuição na expressão de fatores anti-apoptóticos e um aumento na sensibilidade das células a tratamento com cisplatina. A maior expressão de ERK1/2 no tempo de 24 horas em concentrações de 0,1mM de nicotina encontrada nesse trabalho indica que a nicotina é capaz de induzir a expressão de ERK1/2, sugerindo que a mesma passa por processo de tradução para manter o nível basal de proteína não fosforilada, aumentando assim a capacidade de proliferação e invasão celular devido ao aumento de fatores anti-apoptóticos.

A expressão de CA-IX é aumentada em SCC9/24 horas em 0,1mM de nicotina e em câmara de hipóxia. A CA-IX é uma proteína que está entre os 100 genes transcritos pelo complexo HIF-1, sendo responsável pela regulação da homeostase e regulação do pH nos tumores hipóxicos, através da conversão do CO₂ em bicarbonato. A exposição de células HT29 à nicotina aumenta a expressão de CA-IX e de STAT3 fosforilada, porém não houve aumento na expressão da proteína de HIF-1 α (SCHWEIGER et al. 2014). Já SANNER & GRIMSRUD (2015) relatam que a nicotina aumenta a expressão de HIF-1 α *in vivo*, sem alteração num marcador de hipóxia tumoral que é CA-IX. Apesar da lacuna ainda existente sobre os efeitos da nicotina na expressão de CA-IX, é possível que ela induza a expressão de CA-IX, porém as vias que a nicotina modula essa expressão ainda são questionáveis, visto que a expressão desse gene pode ser influenciada pelo complexo HIF-1 e por STAT3 através da indução de Notch-3.

DOK, é uma linhagem celular proveniente de leucoplasia oral displásica. A leucoplasia é lesão pré-maligna diagnosticada com maior frequência na cavidade oral e frequentemente associada ao desenvolvimento da CECp, mas esse processo ainda é totalmente desconhecido por DOK apresentar atividade normal de proteínas supressoras de tumor, como p53 e Rb (DONG et al. 2015). Em relação à expressão em DOK nos tempos de 8 horas e 24 horas, pode-se observar padrões distintos de SCC9 para expressão de todos os genes, demonstrando que a resposta sob exposição de nicotina possa estar interferindo em outras vias totalmente diferentes de SCC9. Avanços na descoberta de novas proteínas que possam ser utilizadas como biomarcadores da via de transformação maligna de células leucoplásicas, estão em fase inicial de estudo (DONG et al. 2015).

Níveis de expressão de Raf ativada nas células exibem curvas de dose/resposta em formato de sino; mostrando que um baixo sinal de Raf promove a progressão do ciclo celular e a entrada na fase S; no entanto uma atividade elevada de Raf inibia a síntese de DNA. Como Raf esta ligada a ativação de ERK1/2 e de PI3K/AKT, essa ativação constante e prolongada provoca a prisão das células em G1 através da indução de p21 e à inibição de Cdk2, um mecanismo crucial para a proteção contra o desenvolvimento de câncer. A indução da paragem do ciclo celular por hiperativação foi observa em fibroblastos primários, células de Schwann, hepatócitos, linfócitos T, queratinócitos, astrócitos e células epiteliais do intestino (MELOCHE; POUYSSE 2007). CHANG et. al. (2002) observou em Fibroblastos de ligamento periodontal de humano que no tempo de 24 horas de exposição a concentrações acima de 50 μ M 52% da atividade de síntese de DNA era inibida, já em 0,4mM a síntese de DNA era completamente inibida; e acima de 5mM eram inibido completamente a síntese proteica das células. Podemos sugerir, que a estimulação continua das vias tanto por fatores de crescimento e ROS gerado pela exposição a nicotina, possa gerar uma continua estimulação de RTK's, culminando na inibição da síntese de DNA de DOK, promovendo uma diminuição na expressão dos genes HIF-1 α , PI3K, AKT, ERK1/2 e CA-IX. Mas não é descartado que outras vias possam estar agindo no processo de malignificação de DOK.

6. Conclusão

- A nicotina mostrou capacidade de induzir um aumento na expressão dos genes HIF-1 α , PI3K, AKT, ERK1/2 e CA-IX em SCC9 no tempo de 24 horas de exposição, na concentração mais baixa utilizada de 0,1mM, quando comparado ao controle. Quando comparado com câmara de hipóxia, a nicotina mostrou induzir uma maior expressão em HIF-1 α , PI3K, AKT e ERK1/2. No entanto, o mesmo não foi observado com o gene CA-IX, apesar dos tratamentos de nicotina modularem sua expressão genica a exposição a câmara de hipóxia induz uma maior expressão.
- Em relação a expressão do gene HIF-1 α tanto em SCC9 quanto em DOK, observa-se que sua expressão em câmara de hipóxia é tempo dependente, pois nota-se que sua expressão, apenas, supera a do controle e das concentrações de nicotina ao decorrer de 24 horas de exposição.
- Em DOK, a nicotina induziu aumentos pontuais em algumas concentrações de nicotina e tempo em relação ao controle. A expressão dos genes PI3K, AKT, ERK1/2 e CA-IX teve uma maior expressão em câmara de hipóxia tanto no tempo de 8 horas quanto no tempo de 24 horas. HIF-1 α , demonstrou uma menor expressão em câmara de hipóxia no tempo de 8 horas, mas em 24 horas essa expressão teve um aumento significativo em relação ao controle e as demais concentrações de nicotina.
- Podemos observar com os dados que câmara de hipóxia é capaz de induzir a expressão dos genes estudados de forma tempo dependente, porém a nicotina não demonstrou a mesma capacidade, sugerindo desta forma que outras vias são ativas em DOK quando exposta a nicotina para sobrevivência celular.

7. Referências

ABIDULLAH, M.; KIRAN, G.; GADDIKERI, K.; RAGHOJI, S.; RAVISHANKAR SHILPA, T. Leuloplakia - Review of a potentially malignant disorder. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 8, p. 4–7, 2014.

AN, H.; CHO, N.; YANG, H.; KWAK, K.; KIM, N.; OH, D.; LEE, S.; KIM, H.; KOH, J. Targeted RNA interference of phosphatidylinositol 3-kinase p110- β induces apoptosis and proliferation arrest in endometrial carcinoma cells. **The Journal of Pathology**, v. 212, n. 2, p. 161–169, jun. 2007.

ARREDONDO, J.; CHERNYAVSKY, A. I.; JOLKOVSKY, D. L.; PINKERTON, K. E.; GRANDO, S. a. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of $\alpha 7$ nicotinic receptor in oral keratinocytes. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 12, p. 2093–2101, 2006.

BOSE, C.; ZHANG, H.; UDUPA, K. B.; CHOWDHURY, P. Activation of p-ERK1/2 by nicotine in pancreatic tumor cell line AR42J: effects on proliferation and secretion. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 289, n. 5, p. G926-34, 2005.

CAGNOL, S.; CHAMBARD, J. C. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - Apoptosis, autophagy and senescence. **FEBS Journal**, v. 277, n. 1, p. 2–21, 2010.

CARNERO, A.; BLANCO-APARICIO, C.; RENNER, O.; LINK, W.; LEAL, J. F. M. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 187–198, 2008.

CHALHOUB, N.; BAKER, S. J. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. **Annual review of pathology**, v. 4, n. 1, p. 127–50.

CHANG, Y.-C. et al. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. **Journal of periodontal research**, v. 37, n. 4, p. 279–285, 2002.

CHEN, Y.; HOU, Q.; YAN, W.; LUO, J.; CHEN, D.; LIU, Z.; HE, S.; DING, X. PIK3CA is critical for the proliferation, invasiveness, and drug resistance of human tongue carcinoma cells. **Oncology research**, v. 19, n. 12, p. 563–71, 2011.

CHI, A.C.; DAY, T.A.; NEVILLE, B. W. Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma—An Update. **CA Cancer J Clin**, v. 65, p. 401–421, 2015.

CHICHE, J., ILC, K., LAFERRIÈRE, J., TROTTIER, E., DAYAN, F., MAZURE, N. M., POUYSSÉGUR, J. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p.358–68, 2009.

DONG, Y.; ZHAO, Q.; MA, X.; MA, G.; LIU, C.; CHEN, Z.; YU, L.; LIU, X.; ZHANG, Y.; SHAO, S.; XIAO, J.; LI, J.; ZHANG, W.; FU, M.; DONG, L.; YANG, X.; GUO, X.; XUE, L.; FANG, F.; ZHAN, Q.; ZHANG, L. Establishment of a new OSCC cell line derived from OLK and identification of malignant transformation-related proteins by differential proteomics approach. **Scientific reports**, v. 5, n. August, p. 12668, 2015.

FANTON C.P., MCMAHON M., PIEPER R.O. Dual growth arrest pathways in astrocytes and astrocytic tumors in response to Raf-1 activation. **J Biol Chem**, v. 276, p. 18871–18877, 2001.

FRESNO VARA, J. a; CASADO, E.; DE CASTRO, J.; CEJAS, P.; BELDA-INIESTA, C.; GONZÁLEZ-BARÓN, M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer treatment reviews**, v. 30, n. 2, p. 193–204, 2004.

GEMENETZIDIS, E.; BOSE, A.; RIAZ, A. M.; CHAPLIN, T.; YOUNG, B. D.; ALI, M.; SUGDEN, D.; THURLOW, J. K.; CHEONG, S. C.; TEO, S. H.; WAN, H.; WASEEM, A.; PARKINSON, E. K.; FORTUNE, F.; TEH, M. T. FOXM1 upregulation is an early event in human squamous cell carcinoma and it is enhanced by nicotine during malignant transformation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.

GRANDO, S. a. Connections of nicotine to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 6, p. 419–429, 2014.

GUO, L.; LI, L.; WANG, W.; PAN, Z.; ZHOU, Q.; WU, Z. Mitochondrial reactive oxygen species mediates nicotine-induced hypoxia-inducible factor-1 α expression in human non-small cell lung cancer cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1822, n.

6, p. 852–61, 2012.

HASHIBE, M.; SANKARANARAYANAN, R.; THOMAS, G.; KURUVILLA, B.; MATHEW, B.; SOMANATHAN, T.; PARKIN, D. M.; ZHANG, Z. F. Alcohol drinking, body mass index and the risk of oral leukoplakia in an Indian population. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 88, n. March, p. 129–134, 2000.

HEEG, S.; HIRT, N.; QUEISSER, A.; SCHMIEG, H.; THALER, M.; KUNERT, H.; QUANTE, M.; GOESSEL, G.; VON WERDER, A.; HARDER, J.; BEIJERSBERGEN, R.; BLUM, H. E.; NAKAGAWA, H.; OPITZ, O. G. EGFR overexpression induces activation of telomerase via PI3K/AKT-mediated phosphorylation and transcriptional regulation through Hif1-alpha in a cellular model of oral-esophageal carcinogenesis. **Cancer Science**, v. 102, n. 2, p. 351–360, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MACHA, M. A.; MATTA, A.; CHAUHAN, S. S.; SIU, K. W. M.; RALHAN, R. Guggulsterone targets smokeless tobacco induced PI3K/Akt pathway in head and neck cancer cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

MAGGIONI, D.; GAINI, R.; NICOLINI, G.; TREDICI, G.; GARAVELLO, W. MAPKs activation in head and neck squamous cell carcinomas. **Oncology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 223–231, 2011.

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 1, p. 1–15, 2002.

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 91, n. 3, p. 386–396, 2016.

MELOCHE, S.; POUYSSÉGUR, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3227–3239, 14 maio 2007.

MINET, E.; ARNOULD, T.; MICHEL, G.; ROLAND, I.; MOTTET, D.; RAES, M.; REMACLE, J.; MICHIELS, C. ERK activation upon hypoxia: Involvement in HIF-1 activation. **FEBS Letters**, v. 468, n. 1, p. 53–58, 2000.

PASTOREKOVA, S., ZATOVICOVA, M., PASTOREK, J. Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 7, p.685–98, 2008.

RAMOS, J. W.; BIOLOGY, C. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 12, p. 2707–19, 2008.

RANKIN, E.B.; GIACCIA, A.J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. **Cell Death Differ.**, v.15, 678-685, 2008.

SANG, N.; STIEHL, D. P; BOHENSKY, J.; LESHCHINSKY, I.; SRINIVAS, V.; CARO, J. MAPK Signaling Up-regulates the Activity of Hypoxia-inducible Factors by Its Effects on p300*. **J Biol Chem**, v. 278, n. 16, p. 14013–14019, 2003.

SANNER, T.; GRIMSRUD, T. K. Nicotine: Carcinogenicity and Effects on Response to Cancer Treatment - A Review. **Frontiers in oncology**, v. 5, n. Aug, p. 196, 2015.

SCHAAL, C.; CHELLAPPAN, S. P. Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. **Molecular cancer research : MCR**, v. 12, n. 1, p. 14–23, 2014.

SCHEPMAN, K.; BEZEMER, P.; VAN DER MEIJ, E.; SMEELE, L.; VAN DER WAAL, I. Tobacco usage in relation to the anatomical site of oral leukoplakia. **Oral Diseases**. v. 7, p. 25–27, 2001.

SCHWEIGER, T.; KOLLMANN, D.; NIKOLOWSKY, C.; TRAXLER, D.; GUENOVA, E.; LANG, G.; BIRNER, P.; KLEPETKO, W.; ANKERSMIT, H. J.; HOETZENECKER, K. Carbonic anhydrase IX is associated with early pulmonary spreading of primary colorectal carcinoma and tobacco smoking. **European Journal of Cardio-thoracic**

Surgery, v. 46, n. 1, p. 92–99, 2014.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway. **Science's STKE**, v. 2007, n. 407, p. cm8-cm8, 2007.

SERRANO, M., LIN, A.W., MCCURRACH, M.E., BEACH, D., LOWE, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. **Cell**. v. 88, p. 593–602, 1997.

SHI, D.; GUO, W.; CHEN, W.; FU, L.; WANG, J.; TIAN, Y.; XIAO, X.; KANG, T.; HUANG, W.; DENG, W. Nicotine Promotes Proliferation of Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Regulating $\alpha 7$ AChR, ERK, HIF-1 α and VEGF/PEDF Signaling. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–11, 2012.

SI, H.; PENG, C.; LI, J.; WANG, X.; ZHAI, L.; LI, X.; LI, J. RNAi-mediated knockdown of ERK1/2 inhibits cell proliferation and invasion and increases chemosensitivity to cisplatin in human osteosarcoma U2-OS cells in vitro. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 4, p. 1291–1297, 2012.

SINGH, S.; PILLAI, S.; CHELLAPPAN, S. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. **Journal of oncology**, v. 2011, p. 456743, 2011.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World cancer report 2014. **World Health Organization**, p. 1–2, 2014.

STOLZE, I. P.; MOLE, D. R.; RATCLIFFE, P. J. Regulation of HIF: prolyl hydroxylases. **Novartis Found Symp.**, v. 272, p.15–25, 2006.

TEPPO, S., SUNDQUIST, E., VERED, M., HOLAPPA, H., PARKKISENNIEMI, J., RINALDI, T., NYBERG, P. The hypoxic tumor microenvironment regulates invasion of aggressive oral carcinoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 4, p.76–89, 2013.

VAN DEN BEUCKEN, T., RAMAEKERS, C. H. M. A, ROUSCHOP, K., KORITZINSKY, M., WOUTERS, B. G. Deficient carbonic anhydrase 9 expression in UPR-impaired cells is associated with reduced survival in an acidic microenvironment. **Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology**, v. 92, n. 3, p.437–42, 2009.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. OUR TENTH YEAR Cancer genes and the pathways they control. v. 10, n. 8, p. 789–799, 2004.

WARD, C., LANGDON, S. P., MULLEN, P., HARRIS, A. L., HARRISON, D. J., SUPURAN, C. T., KUNKLER, I. H. New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, 39(2), p.171–9, 2013.

WIDMANN, C.; GIBSON, S.; JARPE, M. B.; JOHNSON, G. L. Mitogenactivated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol Rev, Bethesda**, v. 79, n. 1, p. 143-180, 1999.

XIA, C.; MENG, Q.; CAO, Z.; SHI, X.; JIANG, B.-H. Regulation of angiogenesis and tumor growth by p110 Alpha and AKT1 via VEGF expression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 209, n. 1, p. 56–66, out. 2006.

XU, J.; HUANG, H.; PAN, C.; ZHANG, B.; LIU, X.; ZHANG, L. Nicotine inhibits apoptosis induced by cisplatin in human oral cancer cells. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 8, p. 739–744, 2007.

ZHANG, J.; ZHANG, L. L.; SHEN, L.; XU, X. M.; YU, H. G. Regulation of AKT gene expression by cisplatin. **Oncology Letters**, v. 5, n. 3, p. 756–760, 2013.

ZHANG, Q.; TANG, X.; ZHANG, Z.-F.; VELIKINA, R.; SHI, S.; LE, A. D. Nicotine induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4686–94, 2007.

ZHANG, J.; WANG, X.; VIKASH, V.; YE, Q.; WU, D.; LIU, Y.; DONG, W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. Figure 1, 2016.